

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 14 mars 2000 (14.03.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02057	Référence du dossier du déposant ou du mandataire AN2c-BE8244
Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 août 1999 (27.08.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 01 septembre 1998 (01.09.98)
Déposant BELMANT, Christian etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 février 2000 (11.02.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Christelle Croci
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

L'invention concerne des composés comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule (I) où R1 est choisi parmi -CH₃ et -CH₂-CH₃, Cat⁺ est un cation organique ou minéral, n est un nombre entier compris entre 2 et 20, leurs procédés de préparation, et leurs applications, notamment thérapeutiques et pour activer les lymphocytes Tγ9δ2 des primates.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PHOSPHOEPOXYDES, PROCEDE DE FABRICATION ET APPLICATIONS

L'invention concerne de nouveaux composés
5 phosphoépoxydes, leur procédé de fabrication et leurs applications pour la stimulation des lymphocytes T γ 9 δ 2 porteurs de récepteurs TCR à régions variables V γ 9 et V δ 2.

Les lymphocytes T γ δ des primates présents dans le sang
périphérique (humains, singes) représentent, chez l'individu sain, habituellement
10 de 1 à 5% des lymphocytes du sang et jouent un rôle dans le système immunitaire. Il a été démontré qu'ils reconnaissent leurs ligands antigéniques par une interaction directe avec l'antigène, sans présentation par les molécules du CMH d'une cellule présentatrice. Les lymphocytes T γ 9 δ 2 (parfois aussi désignés lymphocytes T γ 2 δ 2) sont des lymphocytes T γ δ porteurs de récepteurs TCR à
15 régions variables V γ 9 et V δ 2. Ils représentent la majorité des lymphocytes T γ δ dans le sang humain.

Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes T γ δ exercent une
puissante activité cytotoxique non restreinte par le CMH, particulièrement
efficace pour tuer divers types de cellules, notamment des cellules pathogènes. Il
20 peut s'agir de cellules infectées par des virus (" γ δ T cell activation or anergy during infections : the role of nonpeptidic TCR ligands and HLA class I molecules" Fabrizio POCCIA *et al*, Journal of Leukocyte Biology, 62, 1997, p. 1-5), ou par d'autres parasites intracellulaires tels que les mycobactéries ("The antituberculous *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine is an attenuated
25 Mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic Antigens for human γ δ T cells" Patricia CONSTANT *et al*, Infection and Immunity, vol. 63, n° 12, Dec. 1995, p. 4628-4633) ; ou les protozoaires ("*Plasmodium falciparum* stimuli for human γ δ T Cells are related to phosphorylated Antigens of mycobacteria" Charlotte BEHR *et al*, Infection and Immunity, Vol. 64, n° 8, 1996, p. 2892-
30 2896). Il peut aussi s'agir de cellules cancéreuses ("CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both antiviral and antitumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V γ 9 V δ 2 T lymphocytes" Fabrizio POCCIA

et al, Journal of Immunology, 159, p. 6009-6015 ; "Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by phosphoantigens" Jean-Jacques FOURNIE, Marc BONNEVILLE, Res. Immunol., 66th FORUM IN IMMUNOLOGY, 147, P. 338-347).

Il a été démontré que les lymphocytes T γ 9 δ 2 humains réagissent dans le cas d'une infection mycobactérienne à quatre molécules naturelles non peptidiques de structure phosphatée, désignées phosphoantigènes, qui présentent une activité de stimulation pour une concentration de l'ordre de 1 à 5 nM (nanomolaire) (WO-95/20673 et "Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic Mycobacterial ligands" Patricia CONSTANT *et al*, Science, 264, p. 267-270).

Ces antigènes naturels ne sont pas complètement identifiés. Certains auteurs les ont présentés, à tort, comme des dérivés alcènes du pyrophosphate, notamment l'isopentényl pyrophosphate IPP (US-5 639 653 et "Natural and Synthetic nonpeptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells", Yoshimasa TANAKA *et al*, Nature, 375, 1995, p. 155-158). Néanmoins, il est maintenant démontré qu'aucun de ces prénylpyrophosphates n'est actif à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Les meilleurs résultats obtenus n'arrivent pas à démontrer une activité à moins de 3 μ M pour l'IPP, et à 0,3 μ M pour le diméthylallyl-UTP et le 3-méthyl-2-hexène pyrophosphate. La concentration minimale d'activité de ces composés est donc, au mieux, de l'ordre de 100 fois plus importante que celle des phosphoantigènes naturels.

En ce qui concerne l'IPP, il est à noter en particulier que les dernières publications mentionnées ci-dessus commettent une erreur en déduisant la structure du radical isopentényl à partir de la seule analyse du spectre de masse et de la mise en évidence d'une certaine bioactivité. En effet, outre le fait que le composé analysé dans les publications n'était pas purifié et qu'un spectre de masse ne peut pas identifier des espèces non chargées, on peut démontrer qu'il existe en fait plusieurs milliers de structures chimiques différentes pouvant avoir cette même masse moléculaire et être un substituant du pyrophosphate dans ces molécules.

Le fait que la concentration minimale d'activité de l'IPP soit beaucoup plus élevée (de l'ordre de 1000 fois) et que l'intensité des réponses

lymphocytaires Ty982 obtenues soit beaucoup plus faible que celles des phosphoantigènes naturels démontre que l'IPP n'est pas l'un de ces phosphoantigènes naturels ("A novel nucleotide-containing antigen for human blood $\gamma\delta$ T lymphocytes", Y. Poquet *et al*, Eur. J. Immunol. 1996, 26, p. 2344-2349). Cela est d'ailleurs confirmé par de nombreuses autres constatations : on ne trouve pas d'IPP en concentration suffisante dans les extraits mycobactériens stimulant les lymphocytes Ty982 ; l'IPP n'a pas les mêmes caractéristiques chromatographiques (HPAEC) selon : "High pH anion exchange chromatographic analysis of phosphorylated compounds : application to isolation and characterization of non peptide mycobacterial antigens", Y. Poquet *et al*, Anal. Biochem, 243 n° 1, 1996, p. 119-126, que les phosphoantigènes naturels ; l'IPP et les autres isoprénoïdes naturels sont produits par toutes les cellules vivantes, qui ne stimulent pourtant pas les lymphocytes Ty982.

Par ailleurs, on sait que les substances dont la bioactivité est de l'ordre de ou supérieure à 1 μ M ne sont que rarement compatibles avec les contraintes de rentabilité d'une exploitation à l'échelle industrielle. Ainsi, les phosphoantigènes synthétiques proposés jusqu'à maintenant ne sont pas exploitables à l'échelle industrielle dans des conditions économiques acceptables.

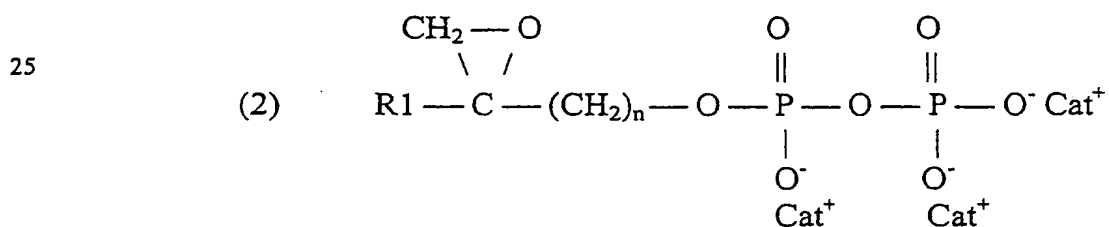
Les phosphoantigènes naturels, quant à eux, ne peuvent être produits qu'en très faibles quantités (WO 95/20673), et leur structure chimique exacte restant encore indéterminée, il n'est pas possible de les produire par synthèse. Il n'est donc pas non plus possible d'envisager une exploitation à l'échelle industrielle dans des conditions économiques, malgré leur grand intérêt thérapeutique démontré.

L'invention vise donc à proposer des nouveaux composés chimiques qui soient activateurs des lymphocytes Ty982 pour une concentration minimale d'activation inférieure à 100nM, notamment de l'ordre de 10nM.

L'invention vise aussi à proposer des composés pouvant être couplés à un grand nombre de groupements organiques, notamment à des groupements peptidiques naturels ou synthétiques, de façon à permettre l'obtention de composés multifonctionnels.

éthyl-1-hexyl-diphosphate ; 6,7-époxy-6-méthyl-1-heptyl-diphosphate ; 6,7-époxy-6-éthyl-1-heptyl-diphosphate ; 7,8-époxy-7-méthyl-1-octyl-diphosphate ; 7,8-époxy-7-éthyl-1-octyl-diphosphate ; 8,9-époxy-8-méthyl-1-nonyl-diphosphate ; 8,9-époxy-8-éthyl-1-nonyl-diphosphate ; 9,10-époxy-9-méthyl-1-décyl-diphosphate ; 9,10-époxy-9-éthyl-1-décyl-diphosphate ; 10,11-époxy-10-méthyl-1-undécyl-diphosphate ; 10,11-époxy-10-éthyl-1-undécyl-diphosphate ; 11,12-époxy-11-méthyl-1-dodécyl-diphosphate ; 11,12-époxy-11-éthyl-1-dodécyl-diphosphate ; 12,13-époxy-12-méthyl-1-tridécyl-diphosphate ; 12,13-époxy-12-éthyl-1-tridécyl-diphosphate ; 13,14-époxy-13-méthyl-1-tétradécyl-diphosphate ; 13,14-époxy-13-éthyl-1-tétradécyl-diphosphate ; 14,15-époxy-14-méthyl-1-pentadécyl-diphosphate ; 14,15-époxy-14-éthyl-1-pentadécyl-diphosphate ; 15,16-époxy-15-méthyl-1-hexadécyl-diphosphate ; 15,16-époxy-15-éthyl-1-hexadécyl-diphosphate ; 16,17-époxy-16-méthyl-1-heptadécyl-diphosphate ; 16,17-époxy-16-éthyl-1-heptadécyl-diphosphate ; 17,18-époxy-17-méthyl-1-octadécyl-diphosphate ; 17,18-époxy-17-éthyl-1-octadécyl-diphosphate ; 18,19-époxy-18-méthyl-1-nonadécyl-diphosphate ; 18,19-époxy-18-éthyl-1-nonadécyl-diphosphate ; 19,20-époxy-19-méthyl-1-eicosyl-diphosphate ; 19,20-époxy-19-éthyl-1-eicosyl-diphosphate ; 20,21-époxy-20-méthyl-1-heneicosyl-diphosphate ; 20,21-époxy-20-éthyl-1-heneicosyl-diphosphate ; 21,22-époxy-21-méthyl-1-docosyl-diphosphate ; 21,22-époxy-21-éthyl-1-docosyl-diphosphate.

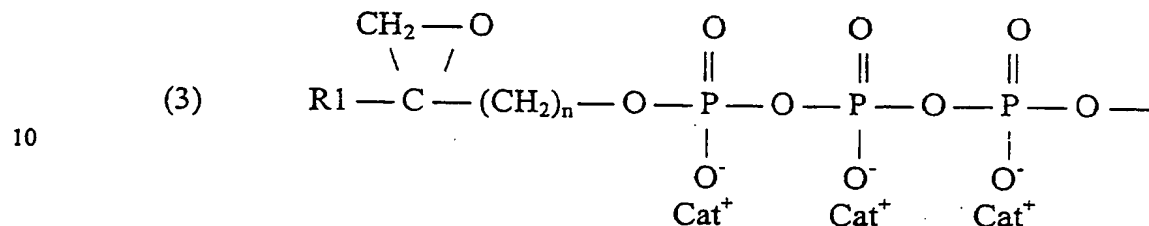
L'invention concerne en particulier les composés phosphoépoxydes répondant à la formule suivante :



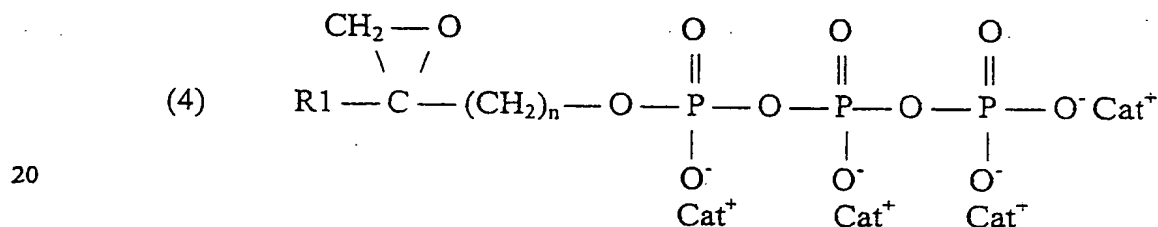
pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives. Il est à noter que la publication M. MUEHLBACHER *et al.* "Isopentenyl-diphosphate isomerase: inactivation of the enzyme with active-site-directed irreversible inhibitors and transition-state analogs", Biochemistry, vol. 27, n° 19, p 7315-7328 (1988), décrit déjà un composé selon la formule (2) dans lequel R1 est CH3

et n = 2, ainsi que son effet *in vitro* en tant qu'inhibiteur de l'enzyme isopentényl pyrophosphate isomérase purifiée à partir de la moisissure *Claviceps purpurea*. Ce document n'enseigne aucune application thérapeutique de ce composé.

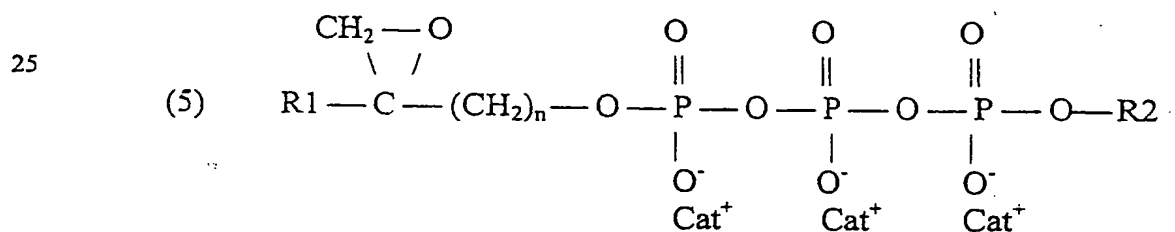
L'invention concerne aussi des nouveaux composés
5 comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :



Parmi les nouveaux composés selon l'invention répondant à
15 la formule (3), on peut citer les composés phosphoépoxydes de formule :

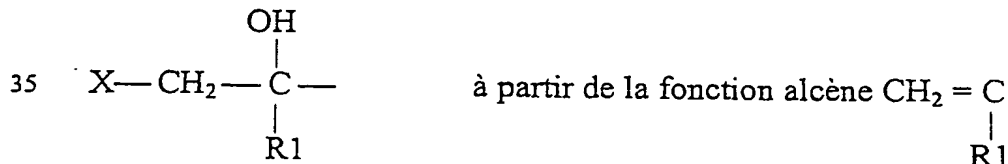


et les composés phosphoépoxydes de formule :



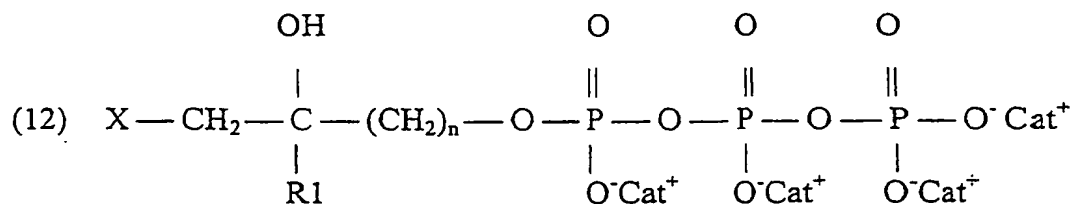
où R2 est un substituant organique ou minéral choisi dans le groupe formé :

- des substituants qui n'empêchent pas la formation de la fonction halohydrine

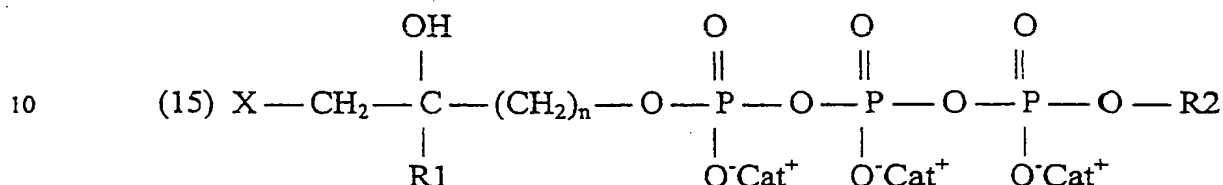


et de l'halogène X_2 en présence d'eau :

40 - des substituants pour lesquels il existe un composé R²-O-Y non réactif sur la fonction halohydrine du composé de formule :



et choisi pour que R2-O-Y puisse réagir sur le phosphate terminal de ce composé (12) pour obtenir le composé de formule (15) :



- et des substituants pour lesquels il existe un composé R2-O-PPP, où PPP symbolise le groupement triphosphate.

Avantageusement, lesdits composés selon l'invention sont caractérisés en ce que $n = 2$ et R1 est CH₃.

Les composés selon l'invention comprennent avantageusement en outre au moins un groupement choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, et des époxydes.

En particulier, l'invention s'étend aux composés phosphoépoxydes selon la formule (5) ci-dessus dans lesquels R2 est en outre choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, des phosphoépoxydes selon la formule (1), et des époxydes.

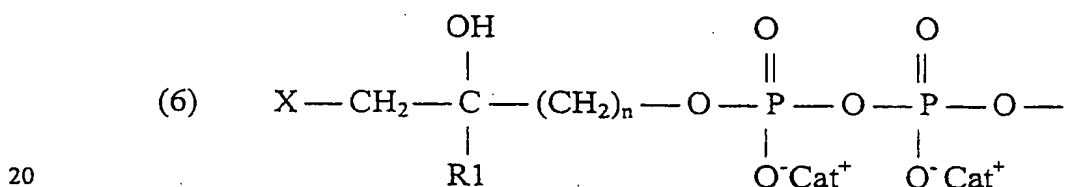
L'invention s'étend aussi aux composés dont la structure incorpore plusieurs groupements conformes à la formule (1), identiques ou différents, par exemple des monomères, polymères, oligomères ou dendrimères, ou plus généralement des molécules à plusieurs branches phosphatées conformes
5 à la formule (1).

Il est à noter que les composés selon l'invention sont des esters (monoesters ou diesters) d'acide phosphorique (ce terme englobant les acides où le phosphore est au degré d'oxydation V, à savoir l'acide orthophosphorique, l'acide pyrophosphorique, l'acide métaphosphorique, l'acide
10 triphosphorique, les autres acides polyphosphoriques).

L'invention s'étend à un procédé de fabrication des composés selon l'invention. Ce procédé est caractérisé en ce que :

- on prépare tout d'abord un composé intermédiaire comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule :

15

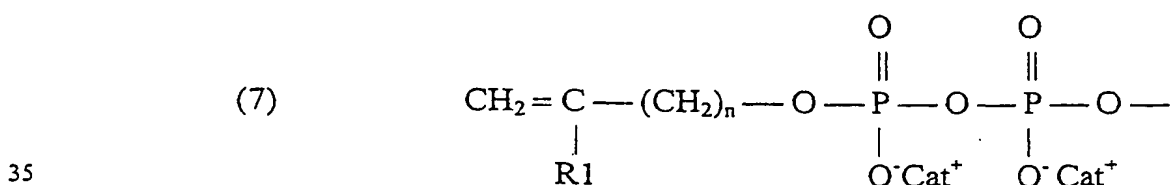


20

où X est un halogène choisi parmi l'iode, le brome et le chlore,

- on fait réagir le composé intermédiaire avec un milieu
25 générateur d'hydroxydes pour transformer les fonctions halohydrines du composé intermédiaire en fonctions époxydes.

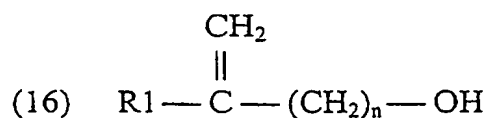
Avantageusement et selon l'invention pour préparer ledit composé intermédiaire, on fait réagir l'halogène X₂ en présence d'eau avec un composé de départ comprenant au moins un groupement alcène phosphaté de
30 formule :



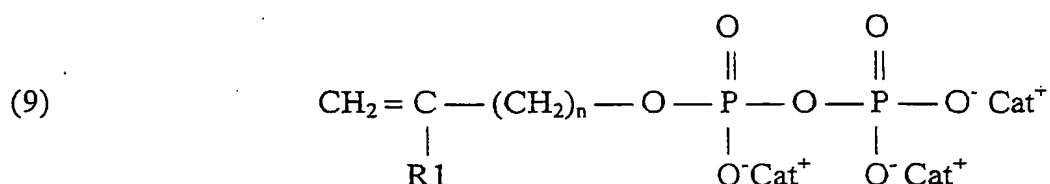
35

Avantageusement et selon l'invention, on fait réagir un sel formé dudit composé de départ en milieu aqueux ou hydroalcoolique, à pH neutre, à une température inférieure à 30°C, par mélange avec une solution aqueuse de l'halogène X₂. Avantageusement et selon l'invention, on effectue la réaction sous pression atmosphérique à une température comprise entre 0°C et 25°C.

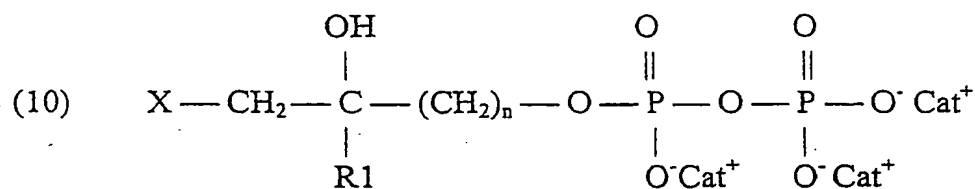
Les composés de départ peuvent être eux-mêmes obtenus à partir de l'alcool :



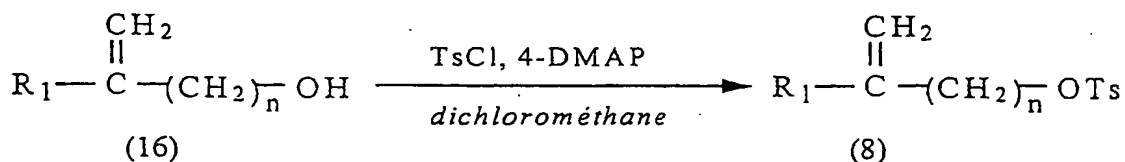
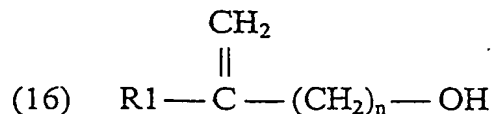
Avantageusement et selon l'invention, le composé de départ est un sel de formule :

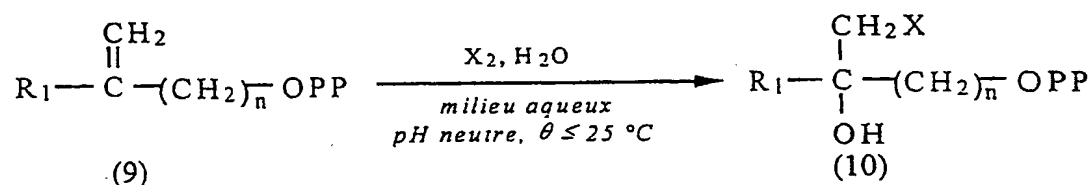
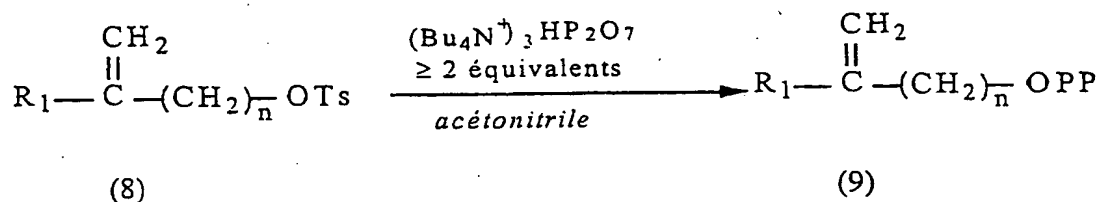


On obtient alors le composé intermédiaire pyrophosphohalohydrine selon la formule :



Un exemple de schéma réactionnel complet d'obtention du composé intermédiaire (10) à partir de l'alcool (16) est le suivant :





où TsCl est le chlorure de tosyle,

4-DMAP est le 4-diméthylaminopyridine,

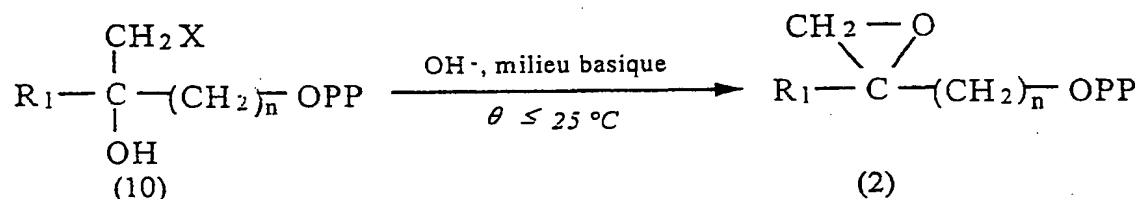
Bu₄N⁺ est le tétrabutylammonium,

(Bu₄N⁺)₃HP₂O₇ est le tris (tétra n-butylammonium) hydrogènoprophosphate,

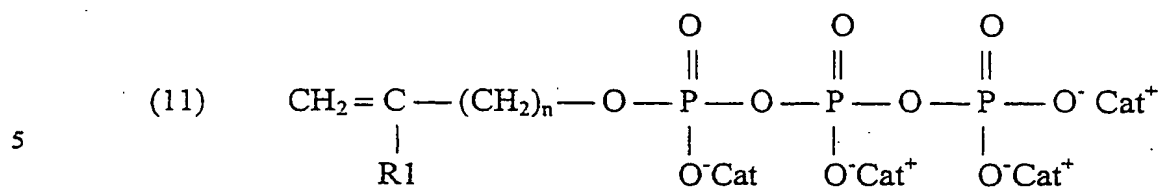
PP symbolise le groupement pyrophosphate.

Les réactions permettant d'obtenir le composé (9) à partir de l'alcool (16) peuvent être effectuées comme décrit par : DAVISSON V.J. *et al.* "Phosphorylation of Isoprenoid Alcohols" J. Org. Chem 1986, 51,4768-4779, et DAVISSON V.J. *et al.* "Synthesis of Allylic and Homoallylic Isoprenoid Pyrophosphates" Methods in Enzymology, 1984, 110, 130-144.

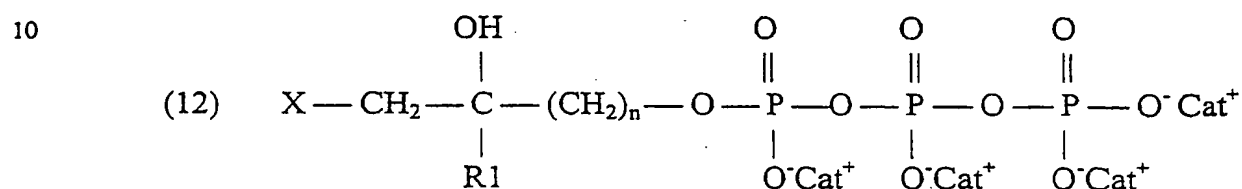
A partir du composé intermédiaire (10), on obtient le composé selon l'invention de formule (2) selon le schéma suivant :



Avantageusement et selon l'invention, le composé de départ est un sel de formule :

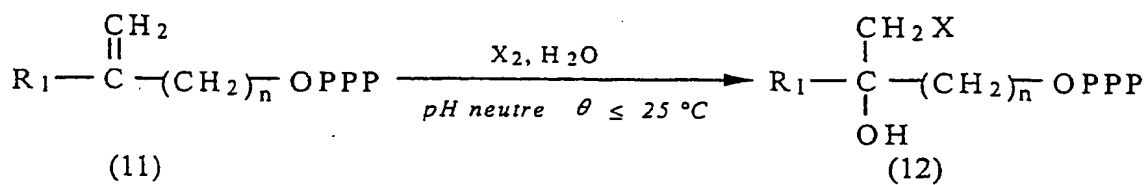
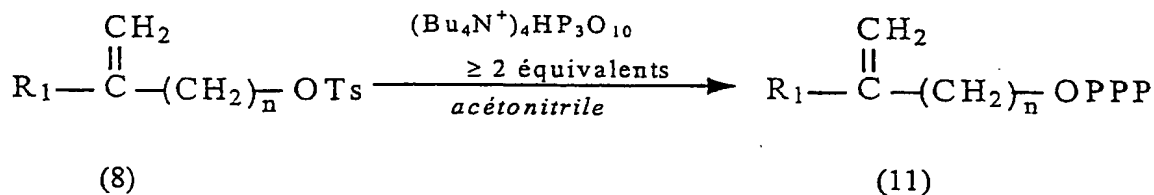


On obtient alors le composé intermédiaire triphosphohalohydrine selon la formule :



On obtient ensuite le composé triphosphoépoxyde (4) selon l'invention.

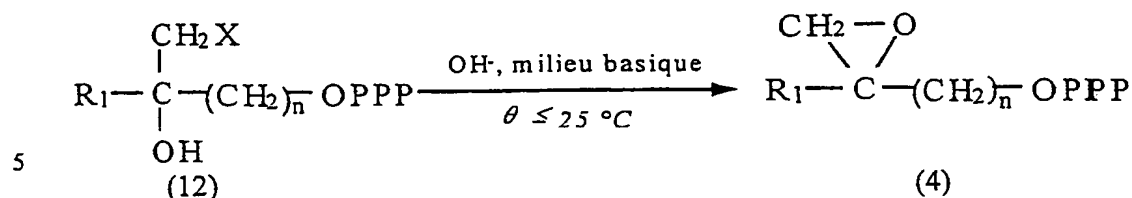
Un exemple de schéma réactionnel complet d'obtention du composé (4) selon l'invention à partir de l'alcool (16) est le suivant :



où PPP est le groupement triphosphate,

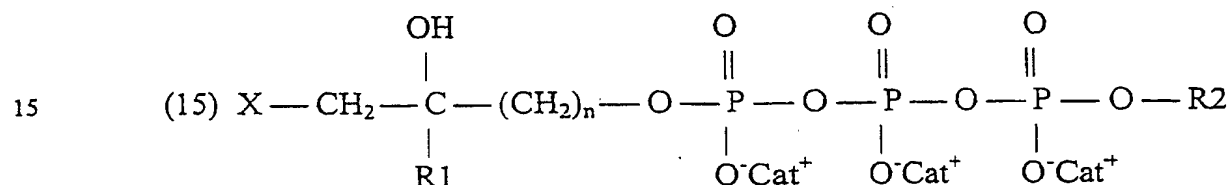
$(\text{Bu}_4\text{N}^+)_4\text{HP}_3\text{O}_{10}$ est le tétrakis (tétra n-butylammonium) hydrogènotriphosphate. Le composé (8) est obtenu à partir de l'alcool (16) comme indiqué précédemment.

A partir du composé intermédiaire (12), on obtient le composé triphosphoépoxyde selon l'invention de formule (4) selon le schéma suivant :

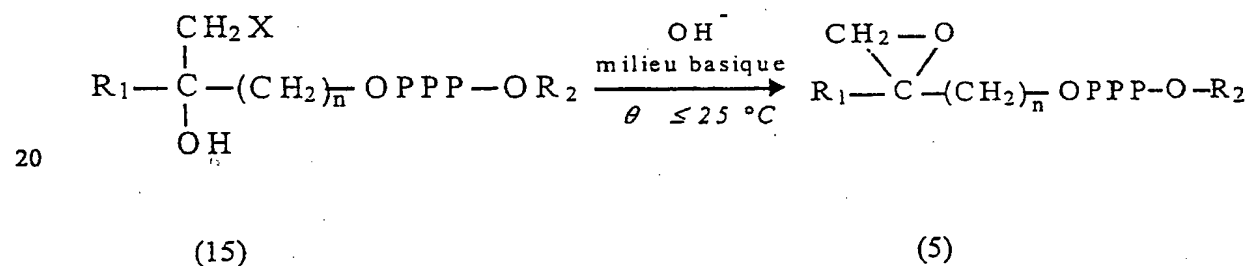


Pour préparer un composé phosphoépoxyde selon l'invention conforme à la formule (5), plusieurs variantes sont possibles.

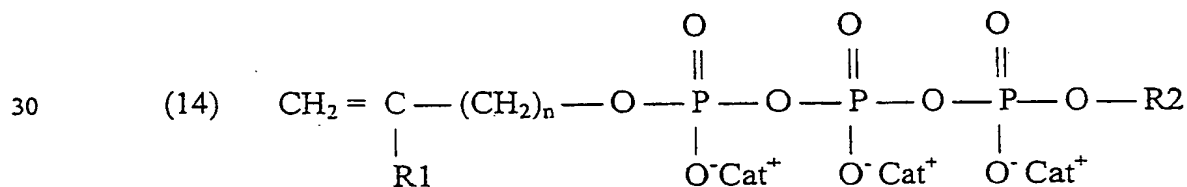
Dans une première variante, on prépare tout d'abord un composé intermédiaire phosphohalohydrine de formule :



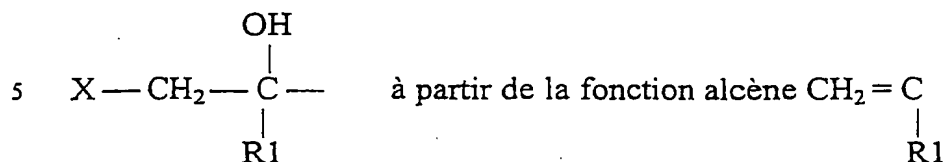
Ainsi, on obtient le composé (5) selon la réaction suivante :



Pour ce faire, on peut effectuer le procédé tel que mentionné ci-dessus (réaction de X_2 en présence d'eau sur une fonction alcène phosphatée) en prenant, à titre de composé de départ, un sel de formule :



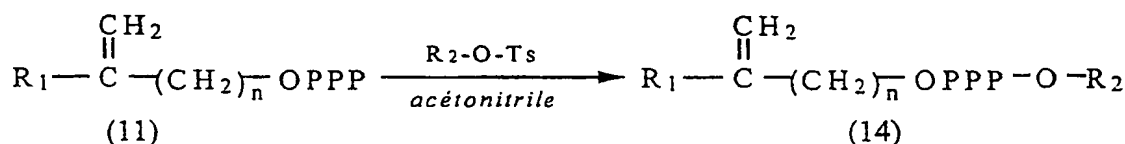
où R₂ est un substituant organique ou minéral adapté pour ne pas empêcher la formation de la fonction halohydrine



et de l'halogène X₂ en présence d'eau.

10 Le composé de départ (14) peut lui-même être préparé selon l'un des schémas réactionnels suivants :

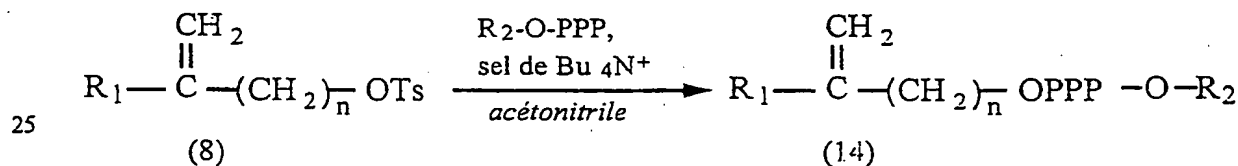
- Schéma réactionnel 1 :



où Ts est le tosyle.

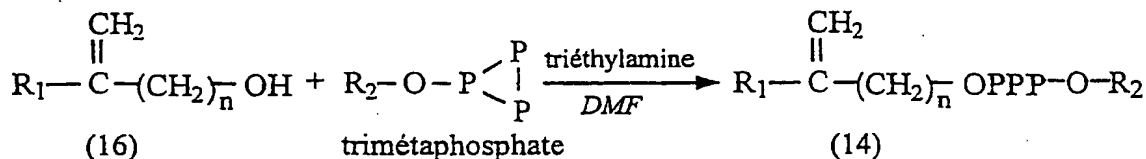
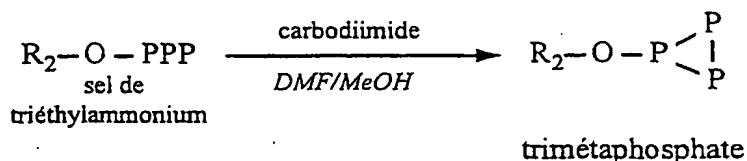
Le composé (11) peut être obtenu comme indiqué précédemment à partir de l'alcool (16) et du composé intermédiaire (8). La réaction permettant d'obtenir le composé (14) à partir du composé (11) peut être effectuée dans des conditions semblables à celles décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al.* Ce schéma peut être utilisé lorsque R₂-O-Ts est commercialement disponible.

- Schéma réactionnel 2 :



Le composé intermédiaire (8) peut être obtenu comme indiqué précédemment à partir de l'alcool (16). La réaction permettant d'obtenir le composé (14) à partir du composé (8) peut être effectuée dans des conditions semblables à celles décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al.* Ce schéma peut être utilisé lorsque R₂-O-PPP est commercialement disponible.

- Schéma réactionnel 3 :



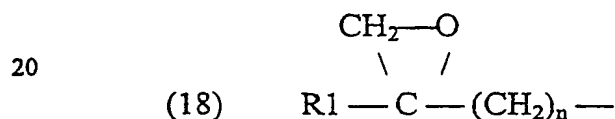
où DMF est le diméthylformamide,

MeOH est le méthanol.

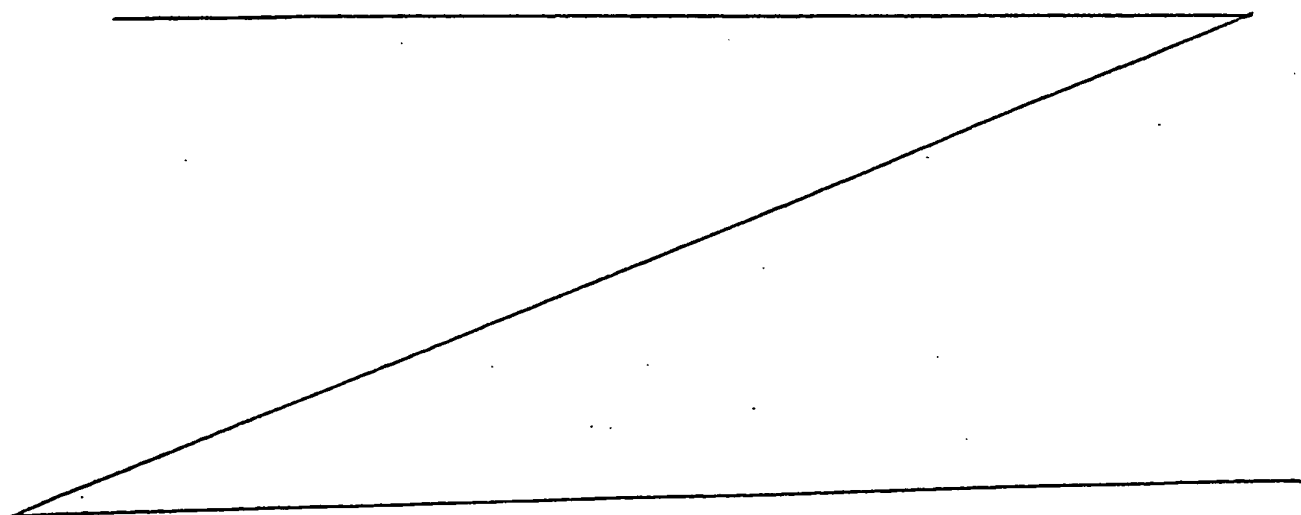
Ce schéma réactionnel 3 peut être mis en œuvre dans des conditions similaires à celles décrites dans D.G. KNORRE *et al* "General method for the synthesis of ATP gamma derivatives" Febs LETTERS, 1976, 70, 105-108.

Ce schéma réactionnel 3 n'est pas utilisable lorsque R2 comporte une fonction réactive au carbodiimide (carboxylate, triphosphate...). Elle est par contre avantageuse lorsque R2-O-PPP est commercialement disponible.

Dans le cas particulier où R2- est lui-même un groupement époxyde de formule :

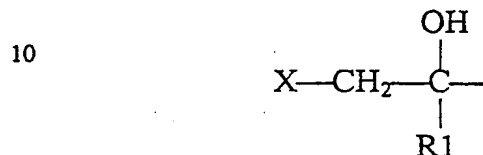


on peut utiliser le schéma réactionnel suivant :



triphosphohalohydrine intermédiaire de formule (12), à partir d'un sel soluble en milieu organique tel qu'un sel de Bu_4N^+ , dans une étape ultérieure avec un composé $\text{R}_2\text{-O-Y}$, où $-\text{O-Y}$ est un groupement partant et R_2 est un substituant organique ou minéral choisis pour que $\text{R}_2\text{-O-Y}$ puisse former, par réaction sur le composé (12), le composé intermédiaire de formule (15).

Pour pouvoir former ainsi le composé intermédiaire selon la formule (15), le composé $\text{R}_2\text{-O-Y}$ ne doit notamment pas être réactif sur la fonction halohydrine :



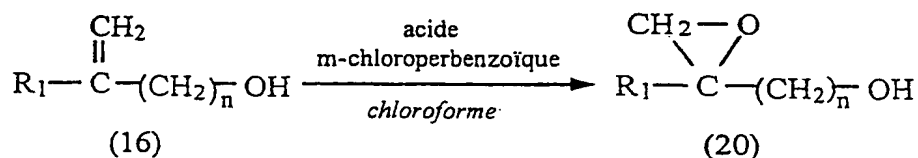
En outre, $\text{R}_2\text{-O-Y}$ doit réagir sur le phosphate terminal du composé (12) pour former le composé (15).

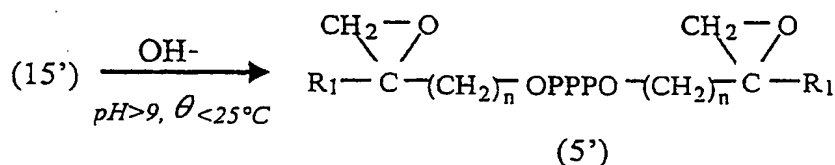
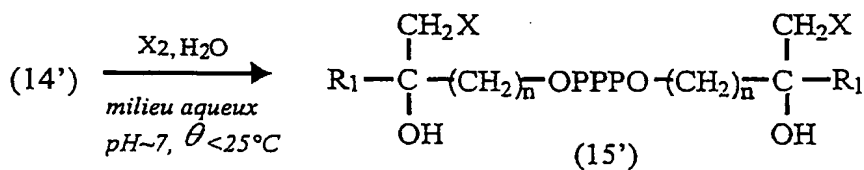
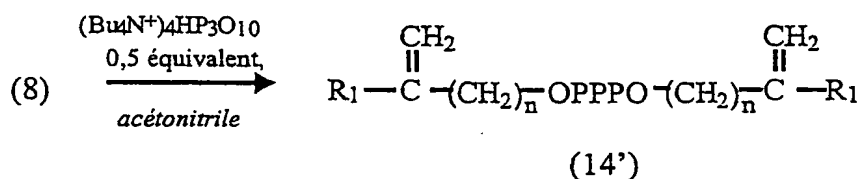
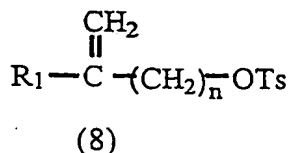
La réaction du composé de formule (12) sur $\text{R}_2\text{-O-Y}$ est une substitution nucléophile. Cette réaction est en particulier possible et avantageuse pour R_2 choisi dans le groupe formé des alkyles et des alcènes. Y est choisi de telle sorte que $\text{R}_2\text{-O-Y}$ puisse donner le composé (15) par substitution nucléophile. Y est par exemple choisi parmi le tosylo, le brosylo et le triflylo.

Cette deuxième variante permet ensuite de préparer le composé phosphoépoxyde selon l'invention de formule (5) en faisant réagir le composé intermédiaire (15) en milieu aqueux basique pour transformer les fonctions halohydrine du composé intermédiaire (15) en fonctions époxydes comme indiqué ci-dessus.

Dans une troisième variante, on peut préparer le composé phosphoépoxyde selon l'invention, sans passer par le composé intermédiaire (15), à partir de l'alcool (16) selon le schéma réactionnel suivant :

30

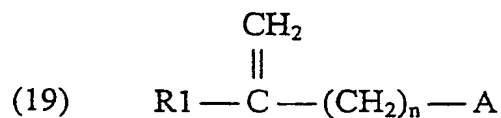




Le composé (5') est un cas particulier de composé (5) selon l'invention.

5 Il est à noter que dans toutes ces réactions, l'acétonitrile peut être remplacé par tout autre solvant dipolaire aprotique (diméthylformamide DMF, diméthylsulfoxyde DMSO...).

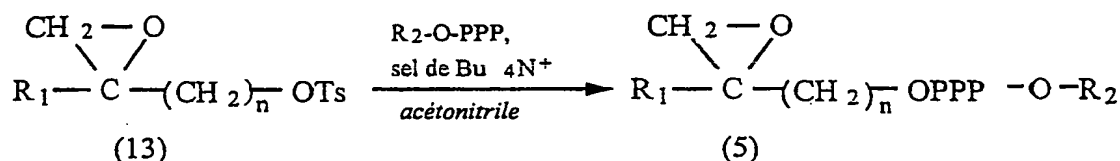
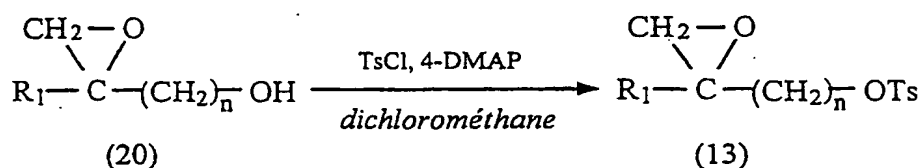
10 Il est à noter qu'à la place du composé intermédiaire (8) pour la préparation des composés (2), (4) et (5'), et dans le cas où $n \neq 2$ on peut aussi utiliser le composé chlorure ou bromure correspondant de formule :



où A est le chlore ou le brome.

15 Les alcools (16) sont commercialement disponibles ou peuvent être aisément obtenus par une réaction de Grignard bien connue entre un organomagnésien d'alcényle et le formaldéhyde ou l'oxyde d'éthylène.

Dans une deuxième variante, pour préparer le composé intermédiaire (15), dans certains cas, on pourrait faire réagir le composé

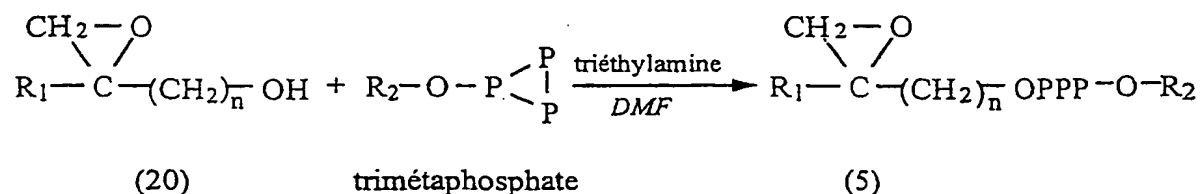
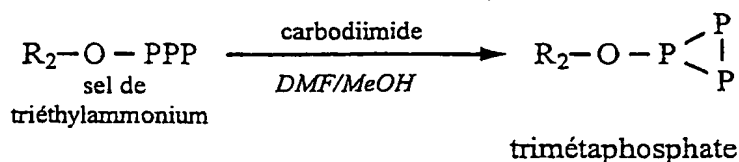


Cette troisième variante est notamment avantageuse lorsque R₂-O-PPP est commercialement disponible ou lorsque la préparation du composé intermédiaire phosphohalohydrine (15) n'est pas possible.

La première étape de cette réaction consistant à transformer la fonction alcène en fonction époxyde, peut être effectuée comme indiqué par M. MUEHLBACHER *et al.* "Isopentenyl-diphosphate isomerase: inactivation of the enzyme with active-site-directed irreversible inhibitors and transition-state analogs", *Biochemistry*, vol. 27, n° 19, p 7315-7328 (1988).

Ce schéma réactionnel peut être aussi utilisé pour obtenir directement les composés monoesters (2) et (4) selon l'invention. Néanmoins, avec ces composés monoesters, la fabrication à partir des composés intermédiaires phosphohalohydrines est en général plus rapide, plus quantitative, et plus facile à mettre en œuvre.

Dans une quatrième variante, on utilise le schéma réactionnel suivant :



Cette réaction peut être effectuée dans les conditions décrites par D.G. KNORRE *et al* "General method for the synthesis of ATP gamma derivatives" Febs letters, 1976, 70, 105-108.

5 Ainsi, un composé selon l'invention peut être bifonctionnel ou multifonctionnel. La(les) fonction(s) phosphoépoxyde(s) procure(nt) la propriété antigénique vis-à-vis des lymphocytes T γ 9 δ 2, et R2 ou les autres groupements fonctionnels du composé peuvent présenter d'autres propriétés, notamment thérapeutiques.

10 Dans le cas d'un composé selon l'invention ayant plusieurs groupements phosphoépoxydes conformes à la formule (1), il suffit soit de partir d'un composé de départ ayant le nombre correspondant de groupements alcènes phosphatés de formule (7) et la structure chimique correspondante (première variante), soit d'utiliser le composé de formule (12) et de le faire réagir avec un
15 composé intermédiaire R2-O-Y ayant le nombre correspondant de fonctions -O-Y (deuxième variante), soit d'utiliser un composé R2-O-PPP incorporant déjà d'autres fonctions époxydes (troisième et quatrième variantes).

L'invention concerne aussi en particulier les nouveaux composés β -esters de phosphoépoxydes de formule :

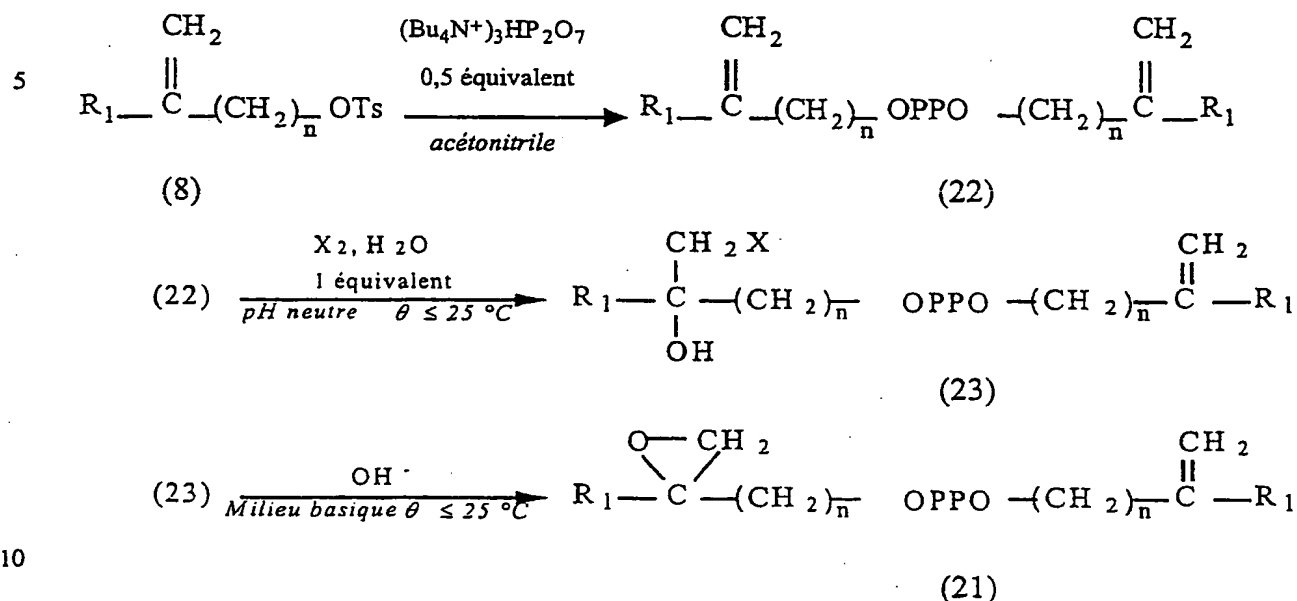


20

(21)

où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$,
n est un nombre entier compris entre 2 et 20.

Ces composés peuvent être obtenus selon le procédé suivant :



L'invention s'étend également aux utilisations des composés selon l'invention à titre d'activateur des lymphocytes Ty982 des primates, notamment à titre d'activateur de la prolifération et/ou de l'activité cytotoxique et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) des lymphocytes Ty982 des primates à récepteurs TCR comprenant les régions variables Vy9 et V82.

L'invention s'étend aussi aux applications des composés selon l'invention pour le traitement de cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates, dans un milieu naturel ou artificiel pouvant contenir des lymphocytes Ty982, dans lequel lesdites cellules peuvent être mises en contact avec ces lymphocytes Ty982, et qui est compatible avec les composés selon l'invention (c'est-à-dire n'est pas susceptible d'en provoquer la dégradation au moins dans certaines conditions du traitement).

Par "cellule sensible aux lymphocytes Ty982", on entend toute cellule sujette à l'activité effectrice induite des lymphocytes Ty982 : mort cellulaire (destruction cellulaire par les lymphocytes Ty982); réception de

cytokine relarguée par les lymphocytes Ty982 (TNF- α , INF- γ ...); éventuellement prolifération cellulaire induite par les lymphocytes Ty982.

L'invention s'étend donc à un procédé d'activation des lymphocytes Ty982 -notamment à un procédé d'activation de la prolifération des lymphocytes Ty982 et/ou de l'activité cytotoxique des lymphocytes Ty982 et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) par les lymphocytes Ty982- dans lequel on met ces lymphocytes Ty982 au contact d'au moins un composé selon l'invention dans un milieu contenant des lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T. Avantageusement et selon l'invention, on introduit dans le milieu une proportion d'interleukine -notamment d'interleukine 2 (IL2)- adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu. En effet, la présence du facteur de croissance lymphocytaire IL2 est indispensable pour obtenir la prolifération des lymphocytes T parmi lesquels seuls les lymphocytes Ty982 ont été activés par un composé selon l'invention. Ainsi, ce facteur de croissance doit être présent dans le milieu pour les applications où l'on recherche une prolifération des lymphocytes Ty982. Ce facteur de croissance lymphocytaire peut préexister à l'état naturel, ou être induit ou introduit dans le milieu, simultanément ou non à l'incorporation du composé selon l'invention, dans la même composition thérapeutique ou non. Néanmoins, pour certaines applications où une activation sans prolifération des lymphocytes Ty982 est recherchée (par exemple la cytotoxicité induite), la présence de ce facteur de croissance n'est pas utile.

Plus particulièrement, l'invention s'étend aux applications des composés selon l'invention à titre thérapeutique pour le traitement curatif ou préventif des pathologies produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates dans un milieu pouvant contenir ces lymphocytes Ty982 et dans lequel ces cellules peuvent être mises au contact des lymphocytes Ty982.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise au moins un composé selon l'invention à une concentration dans le milieu qui procure une activation de la prolifération polyclonale des lymphocytes Ty982. Ce milieu peut être choisi parmi le sang humain, le sang d'un primate non humain, les extraits de sang humain, et les extraits de sang d'un primate non humain.

Ledit milieu peut être extracorporel, ledit procédé d'activation selon l'invention étant alors un traitement cellulaire extracorporel, pouvant notamment servir en laboratoire, par exemple pour l'étude des lymphocytes Ty982 ou de leurs propriétés, ou à des fins de diagnostic.

5 L'invention s'étend aussi à une composition pour le diagnostic extracorporel (*ex vivo*) caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'invention.

Ledit milieu peut être aussi intracorporel, l'activation des lymphocytes Ty982 ayant alors une utilité thérapeutique.

10 Plus particulièrement, ledit milieu est le sang périphérique d'un primate. L'invention s'étend donc en particulier à un procédé d'activation des lymphocytes Ty982 du sang périphérique d'un primate -notamment de l'homme- dans lequel on administre une quantité apte à activer les lymphocytes Ty982 d'au moins un composé selon l'invention. On administre donc au moins un composé selon l'invention par voie générale -notamment parentérale dans le sang
15 périphérique-.

Ledit milieu peut aussi être un site cellulaire à traiter, et on administre au moins un composé selon l'invention directement au contact du site cellulaire à traiter (administration topique).

L'invention s'étend ainsi en particulier aux applications
20 thérapeutiques des composés selon l'invention pour le traitement des pathologies des primates appartenant au groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, notamment mycobactériennes (lèpre, tuberculose...) ; des parasitoses (paludisme...) ; des pathologies à syndrome d'immunodéficience (SIDA, ...). Selon l'invention, on administre une composition thérapeutique adaptée pour
25 libérer dans le sang périphérique et/ou sur un site cellulaire à traiter une quantité d'au moins un composé selon l'invention apte à activer les lymphocytes Ty982. En effet, il a été démontré de façon générale dans l'art antérieur sus-cité qu'une composition ayant la propriété d'activer les lymphocytes Ty982 peut être avantageusement utilisée pour le traitement de ces pathologies.

30 De façon traditionnelle, dans tout le texte, les termes "thérapie" ou "thérapeutique" englobent non seulement les traitements curatifs ou les soins, mais également les traitements préventifs (prophylaxie) tels que la

vaccination ainsi que le diagnostic intracorporel (administration à des fins de diagnostic). En effet, en permettant l'activation des lymphocytes Ty982, l'invention permet des traitements d'immunostimulation pouvant être avantageux aussi bien à titre prophylactique en empêchant le développement de cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes Ty982, qu'à titre curatif en induisant la destruction de cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes Ty982.

L'invention s'étend ainsi à une composition thérapeutique comprenant au moins un composé selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention concerne une composition thérapeutique comprenant une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique d'au moins un composé selon l'invention -notamment pour le traitement préventif ou curatif des pathologies sus-citées-. Une composition selon l'invention peut être une composition immunostimulante, ou un vaccin, les composés selon l'invention étant des antigènes activant les lymphocytes Ty982.

Avantageusement et selon l'invention, la composition thérapeutique est caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une proportion d'interleukine -notamment d'interleukine 2- adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu où elle est destinée à être administrée.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut être préparée sous une forme galénique apte à être administrée par voie générale, notamment par voie parentérale directement dans le sang périphérique d'un primate, avec au moins un composé selon l'invention en quantité adaptée pour activer les lymphocytes Ty982 et un ou plusieurs excipient(s) approprié(s). Compte tenu de la très faible valeur de la concentration active des composés selon l'invention (de l'ordre de 1 à 100 nM), une telle administration est envisageable sans risque de toxicité.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi être préparée sous une forme galénique appropriée pour son administration topique, directement au contact des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982.

La forme galénique d'une composition thérapeutique selon l'invention est réalisée selon la voie d'administration choisie, par les techniques traditionnelles de formulation galénique. La quantité et la concentration de

composé(s) selon l'invention, et la posologie sont déterminées par référence aux traitements chimiothérapeutiques connus des maladies à traiter, compte tenu de la bioactivité des composés selon l'invention vis-à-vis des lymphocytes T γ 982, de l'individu à traiter, de la maladie concernée et des effets biologiques recherchés.

5 Avantageusement et selon l'invention, pour un composé bioactif à une concentration comprise entre 10nM et 100nM, on administre par voie générale une quantité de composé(s) selon l'invention comprise entre 1 μ g et 1000 μ g –notamment entre 10 μ g et 100 μ g- par kilogramme de poids du patient.

10 Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que les composés selon l'invention ne présentent aucune toxicité générale, même pour des concentrations pouvant aller jusqu'à 100 μ M, soit de l'ordre de 10⁴ fois la concentration bioactive. En outre, on sait que la catégorie biochimique de molécules à laquelle les composés selon l'invention appartiennent (phosphoesters) constitue une famille de composés métabolites rencontrés dans
15 toute cellule vivante. Les composés selon l'invention ne présentent donc pas d'autres effets toxiques que ceux induits par leur bioactivité sur les lymphocytes T γ 982.

 En outre, certains composés selon l'invention présentent un poids moléculaire suffisamment faible (notamment inférieur à 500) pour être
20 compatible avec leur élimination par voie rénale et urinaire.

 Un exemple de formulation de composition thérapeutique injectable selon l'invention pour un primate de 1kg est le suivant : 50 μ g de 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-diphosphate (Epoxy-PP) dilués dans 0,5ml de tampon phosphate stérile à pH 7 amenés à 37°C.

25 On administre ainsi 50 μ g d'Epoxy-PP (composé de formule (2)) pour 1kg d'animal, correspondant à une concentration dans le sang circulant adaptée pour être supérieure à la concentration bioactive de l'Epoxy-PP (une concentration de 100nM d'Epoxy-PP correspondant à environ 50ng/ml).

 Il est à noter que les excipients ou autres additifs
30 pharmaceutiquement acceptables traditionnellement utilisés, sont chimiquement compatibles avec les composés selon l'invention.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi avantageusement comprendre un ou plusieurs autre(s) principe(s) actif(s), notamment pour procurer un effet synergique. En particulier, un composé selon l'invention peut faire office d'adjuvant de vaccin. La composition thérapeutique vaccinnante selon l'invention est alors formée d'une composition vaccinnante connue à laquelle on rajoute une quantité de composé(s) selon l'invention apte à activer les lymphocytes Ty982 qui non seulement pourront exercer directement leur activité anti-infectieuse, mais aussi activer les lymphocytes T effecteurs de la réponse vaccinnale traditionnelle.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi incorporer elle-même des lymphocytes Ty982 de primates en culture dans un milieu compatible avec la croissance lymphocytaire T. Elle peut alors servir au traitement des primates, ou plus généralement des animaux vertébrés avec lesquels l'administration des lymphocytes Ty982 de primates peut être effectuée dans des conditions de compatibilité immunitaire vis-à-vis desdits lymphocytes Ty982 de primates. Une telle composition selon l'invention peut être administrée par voie générale, ou même par voie topique, au contact des cellules cibles pathogènes, sensibles auxdits lymphocytes Ty982 de primates.

L'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention porte sur l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie de l'homme ou de l'animal vertébré produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates -notamment une pathologie sélectionnée dans le groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, des parasitoses et des pathologies à syndrome d'immunodéficience-. A ce titre, l'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate -notamment à l'homme- pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie telle que mentionnée ci-dessus.

L'invention s'étend aussi à un procédé de fabrication d'une composition -notamment une composition thérapeutique- selon l'invention ayant la propriété d'activer les lymphocytes T γ 9 δ 2, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention.

5 L'invention porte aussi sur un procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie de l'homme ou de l'animal vertébré produisant des cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes T γ 9 δ 2 de primates, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention. L'invention porte en particulier sur un procédé de
10 fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée - notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes T γ 9 δ 2 -notamment une pathologie appartenant au groupe mentionné ci-dessus-, dans lequel on utilise au moins un composé selon
15 l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, dans un procédé de fabrication selon l'invention, on met au moins un composé selon l'invention au contact d'un milieu contenant des lymphocytes T γ 9 δ 2 de primates, et compatible avec la croissance lymphocytaire T, en une quantité adaptée pour activer ces
20 lymphocytes T γ 9 δ 2 dans ce milieu. Avantageusement et selon l'invention, ledit milieu comprend une substance choisie parmi le sang des primates et les extraits de sang des primates. On obtient alors une composition thérapeutique contenant des lymphocytes T γ 9 δ 2 activés, permettant de réaliser une approche thérapeutique cellulaire.

25 Il est à noter que les composés selon l'invention sont époxydiques et ne correspondent pas aux phosphoantigènes naturels, notamment aux molécules dites Tubag1, Tubag2, Tubag3 et Tubag4 obtenues comme décrit par WO 95/20673. En effet, on démontre par exemple que ces phosphoantigènes naturels sont dégradés par l'eau de brome ou par traitement au borohydrure de
30 sodium en milieu aqueux basique, alors que les composés selon l'invention ne sont pas sensibles à ces réactifs. Les composés selon l'invention ne sont donc pas des antigènes naturels, mais sont des antigènes synthétiques activateurs des

lymphocytes Ty982 à des concentrations du même ordre, et avec une efficacité semblable voire même supérieure à celle des antigènes naturels.

Il est aussi à noter que, contrairement à l'état de la technique tel qu'illustré par US-5639653 qui considérait que la présence d'un groupe alkyle ou alcène était indispensable pour activer les lymphocytes Ty982 humains, les inventeurs ont constaté qu'en détruisant la liaison alcène en lui substituant un groupe époxyde, une activation des lymphocytes Ty982 extrêmement forte et à très faible concentration est obtenue. En particulier, on constate que l'effet peut même dépasser celui des phosphoantigènes d'origine naturelle.

D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention apparaissent à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatifs uniquement à des fins de compréhension, ainsi que des figures dans lesquelles :

- la figure 1 est un graphe représentant des résultats obtenus dans l'exemple 5,
- la figure 2 est un graphe représentant des résultats obtenus dans l'exemple 6.

EXEMPLE 1 : Fabrication du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-diphosphate (Epoxy-PP)

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate (isopentényl tosylate) :

Dans un réacteur en verre équipé pour la manipulation sous atmosphère inerte et soigneusement séché, sont introduits sous agitation magnétique (2,32 mmoles - 442mg) de chlorure de tosyle et (2,55 mmoles - 312 mg) de 4-(N,N-diméthylamino)pyridine dans 5 ml de dichlorométhane anhydre. A ce mélange, on ajoute lentement à l'aide d'une seringue et par l'intermédiaire d'un septum (2,32 mmoles - 200 mg) d'isopenténol en solution dans environ 1ml de dichlorométhane. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince de silice (gel de silice 60 F-254 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15 v/v - R_f (produit) = 0,4 et R_f (TsCl) = 0,5). Après environ 3 heures d'agitation sous atmosphère d'azote on dilue le mélange réactionnel dans un grand volume d'hexane (environ 100ml) ce qui entraîne la formation immédiate d'un précipité blanc. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat concentré par évaporation sous

pression réduite. La solution est diluée avec du diéthyl éther et filtrée à nouveau. Après évaporation du solvant, on obtient une huile jaunâtre. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne préparatrice de silice (gel de silice 60 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15). (1,98 mmoles - 475 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate (85 % en rendement isolé) sont ainsi obtenus. Le composé (huile incolore) est stocké à + 4°C en milieu anhydre.

Préparation du tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate :

(4,5 mmoles - 1g) de sel de disodium dihydrogènapyrophosphate ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) sont dissous dans 10 ml d'eau déionisée froide préalablement ajustée à pH 9 par une solution d'ammoniacale 10mM. La solution est passée sur une colonne contenant (19 milliéquivalents - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme H^+). La solution acide est éluée avec 15-20 ml d'eau déionisée froide à pH 9. La solution collectée est immédiatement titrée à pH 7,3 par une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium (Bu_4NOH) à 40%. Après lyophilisation on obtient 4 g de sel de tétra-n-butylammonium sous la forme d'un solide blanc hygroscopique. Le sel est dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite filtrée puis séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient ainsi une solution de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate avec une pureté égale à 98 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC). Le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (isopentényl pyrophosphate) :

Dans un réacteur en verre soigneusement séché, on introduit sous atmosphère d'azote 2,5 ml d'une solution de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate à 0,7 M (1,75 mmoles) dans l'acétonitrile anhydre. Le réacteur est refroidi par un bain de glace puis on ajoute sous agitation magnétique et à l'aide d'une seringue (0,70 mmoles - 168 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate en solution dans un minimum d'acétonitrile (0,5 - 1M). Après introduction du tosylate, le bain de glace est retiré puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est alors suivi par chromatographie ionique (HPAEC). Après environ 3 heures, le

solvant est évaporé sous pression réduite et le milieu réactionnel redissout dans 3 ml d'un mélange eau /2-propanol 98/2 (v/v). La solution est passée sur une colonne contenant (19 milliéquivalents - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme NH_4^+) puis éluée avec 10 ml du mélange eau (pH 9)/2-propanol 98/2 (v/v). Après lyophilisation, on recueille un solide blanc contenant le produit brut.

Purification :

Le pyrophosphate et les traces de monophosphate d'ammonium sont séparés du milieu par co-précipitation en présence d'hydrogénocarbonate d'ammonium. On dissout le produit brut obtenu à l'étape précédente dans 4 ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M que l'on transfère dans un tube à centrifugation de 25 ml. On traite alors la solution avec 10 ml d'un mélange acétonitrile/2-propanol 1/1 (v/v) en agitant vigoureusement le mélange (vortex) pendant quelques minutes jusqu'à formation d'un précipité blanc. Le tube est ensuite centrifugé à 2000 tr/min à 10 °C pendant 5min. Le surnageant, dans lequel sont extraits les sels organiques, est conservé à +4°C. La procédure est renouvelée en redissolvant le précipité dans 3ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M auxquels on ajoute 7 ml du mélange acétonitrile/2-propanol. Les deux surnageants sont regroupés et le solvant évaporé sous vide. On obtient un liquide huileux que l'on conserve à +4°C.

Le tosylate d'ammonium est séparé du milieu réactionnel par extraction avec le solvant chloroforme/méthanol 1/1 (v/v). Le liquide huileux de l'étape précédente est dissout dans 4 ml d'eau à pH 9 et traité avec 1ml de ce solvant par une procédure classique d'extraction répétée 3 fois. On élimine ensuite de la phase aqueuse les traces de solvant par évaporation sous pression réduite à 30 °C. On obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 83 % en 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (0,58 mmoles - 172 mg). La solution est stockée à -20 °C.

Le produit est purifié ultérieurement selon les besoins par chromatographie d'échange d'anions sur cartouches Sep-Pak Accell Plus QMA (Waters®) de 360 mg à 10 grammes éluées successivement par des solutions aqueuses d'hydrogénocarbonate d'ammonium respectivement de 20 mM, 40 mM, 100 mM, puis 200 mM avec suivi chromatographique (HPAEC) des

fractions éluées. Les fractions correspondant au produit purifié sont regroupées puis lyophilisées.

Préparation du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate:

(0,34 mmole - 100 mg) d'isopentényl-diphosphate (sel d'ammonium) en solution dans 2 ml d'eau déionisée de pH neutre sont traitées sous une hotte aspirante et à température ambiante par 1,9 ml (0,34 mmoles) de brome en solution aqueuse saturée (0,18 M). L'eau de brome est ajoutée progressivement en agitant périodiquement jusqu'à décoloration de l'eau de brome. Dans le cas où le brome est ajouté en léger excès (coloration jaune persistante), la solution est transférée dans un ballon en verre puis placée quelques minutes sous pression réduite (évaporateur rotatif) à une température de 30 °C jusqu'à disparition de la coloration. La solution aqueuse est filtrée puis neutralisée par passage sur colonne de résine cationique DOWEX® 50-WX8-200 (forme NH_4^+) éluee par deux volumes de colonne d'eau déionisée. On obtient quantitativement une solution de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (0,33 mmoles - 130 mg) que est stockée à -20°C.

Préparation du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-diphosphate :

On traite à température ambiante, 1ml de la solution aqueuse contenant (3,35 mg - 8,5 μmoles) de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (sel d'ammonium) obtenue à l'étape précédente avec 1ml d'une solution molaire d'ammoniaque. La solution est maintenue sous agitation pendant quelques minutes puis lyophilisée pour éliminer l'ammoniaque. Le résidu sec obtenu après lyophilisation (2,7 mg - 8,5 μmoles) est redissout dans 2 ml d'eau déionisée. Les ions bromures sont éliminés de la solution en utilisant un dispositif DIONEX® composé d'une cartouche OnGuard®-Ag fixée sur une cartouche OnGuard®-H. (capacité de 1,8 milliéquivalents). Les ions halogénures (bromures) sont retenus sélectivement par passage de la solution sur ce dispositif que l'on élue avec 1 ml d'eau déionisée. Pour la mise en oeuvre de tests biologiques les solutions aqueuses du produit sont stérilisées par filtration sur filtre de 0,2 μm et stockées à -20 °C. Dans le cas de tests réalisés *in vivo*, les solutions sont préalablement passées sur une colonne de résine cationique DOWEX® 50-WX8-200 (forme Na^+) éluee par deux volumes de colonne d'eau déionisée.

EXEMPLE 2 : Fabrication du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-triphosphate (Epoxy-PPP) :

Préparation du tétrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate :

(2,1 mmoles - 1g) de sel de pentasodium tripolyphosphate hexahydrate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sont dissous dans 10 ml d'eau déionisée froide préalablement ajustée à pH 9 par une solution d'ammoniaque 10mM. La solution est passée sur une colonne contenant (21 milliéquivalents - 4,4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 (forme H^+). La solution acide est éluée avec 20-25 ml d'eau déionisée froide à pH 9. La solution collectée est immédiatement
10 titrée à pH 7,0 par une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium (Bu_4NOH) à 40%. Après lyophilisation on obtient 2,5g de sel de tétra-n-butylammonium sous la forme d'un solide blanc hygroscopique. Le sel est dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite filtrée puis séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient
15 ainsi une solution de tétrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate avec une pureté égale à 95 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC). Le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate (isopentényl triphosphate):

20 En suivant la procédure décrite pour la préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (exemple 1), on fait réagir sous atmosphère d'azote 2 mmoles d'une solution molaire de tétrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate avec (1 mmole - 240mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate préparé selon l'exemple 1 dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pendant 24
25 heures. En utilisant une procédure de purification par précipitation-extraction analogue à celle appliquée au 3-méthyl-3-butène-1-yl-diphosphate, on obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 74 % en 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate (0,74mmole - 292mg). Pour la
30 préparation de phosphoépoxydes selon l'invention, dans le cadre de tests biologiques, on utilise une fraction du produit obtenu à ce stade que l'on purifie par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. On prépare de cette manière environ 2 ml d'une solution

aqueuse millimolaire de pH neutre de 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate sous forme de sel d'ammonium.

Préparation du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate :

500 nmoles (500 μ l d'une solution millimolaire)
5 d'isopentényl triphosphate sont traitées à température ambiante par ajout de 500 nmoles de brome en solution aqueuse saturée (2,8 μ l d'eau de brome à 180 mM). Après agitation du mélange et décoloration de l'eau de brome (quasi instantanée), le produit 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate est généré quantitativement (0,5ml d'une solution millimolaire).

10 Préparation du 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-triphosphate :

La solution obtenue à l'étape précédente contenant 500 nmoles de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate est injectée en plusieurs fractions dans un système d'HPAEC Dionex® selon "High pH anion exchange chromatographic analysis of phosphorylated compounds : application to isolation
15 and characterization of non peptide mycobacterial antigens", Y. Poquet *et al*, Anal. Biochem, 243 n° 1, 1996, p. 119-126. L'époxyde est formé quantitativement à chaque passage chromatographique et collecté en présence d'hydroxyde ou d'hydrogénocarbonate d'ammonium. Les fractions collectées sont lyophilisées. On prépare de cette manière environ 1 ml d'une solution aqueuse à
20 500 μ M de 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl-triphosphate qui est traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 3 : Fabrication du α,γ di-(3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl)-triphosphate (di EpoxTP) :

25 Préparation du α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate :

En suivant la procédure décrite pour la préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (exemple 1), on fait réagir sous atmosphère d'azote 0,5 mmoles d'une solution molaire de tetrakis(tetra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate (préparé selon l'exemple 2) avec (1 mmole - 240 mg) de
30 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate (préparé selon l'exemple 1) dans 4ml d'acétonitrile anhydre pendant 24 heures. En utilisant une procédure de purification par précipitation-extraction analogue à celle appliquée au 3-méthyl-

3-butène-1-yl)-diphosphate, on obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 81 % en α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate (0,4 mmoles - 178 mg). Pour la préparation de phosphohalohydrines dans le cadre de tests biologiques, on utilise une fraction du produit obtenu à ce stade que l'on purifie par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. Avant chaque passage chromatographique et pour une meilleure isolation du produit, on effectue un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline de la fraction à purifier pour dégrader l'isopentényl triphosphate, qui est un sous produit de la réaction. On prépare de cette manière environ 1 ml d'une solution aqueuse millimolaire de pH neutre de α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate sous forme de sel d'ammonium.

Préparation du α,γ di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate :

250 nmoles (250 μ l d'une solution millimolaire) de α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate sont traitées à température ambiante par ajout de 250 nmoles de brome en solution aqueuse saturée (1,4 μ l d'eau de brome à 180 mM). Après agitation du mélange et décoloration de l'eau de brome (quasi instantanée), le produit α,γ di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate est généré quantitativement (250 μ l d'une solution millimolaire).

Préparation du α,γ di-(3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl)-triphosphate :

La solution obtenue à l'étape précédente contenant 250 nmoles de α,γ di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate est injectée en plusieurs fractions dans un système d'HPAEC Dionex® DX500 comme décrit dans l'exemple 2. On prépare de cette manière environ 0,5 ml d'une solution aqueuse à 500 μ M de α,γ di-[3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl]-triphosphate qui est traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 4 : Fabrication de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl) (EpoX-UTP) :

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3-méthyl-3-butène-1-yl) :

Ce produit est préparé selon la procédure décrite par KNORRE D. C. et al. "General Method for the synthesis of ATP Gamma-

derivatives" Febs Letters, 1976, 70-1, 105-108, à partir de 40 μ moles d'uridine-5'-triphosphate (UTP) (sel de triéthylammonium) en présence d'un excès d'isopenténol. Pour la préparation de phosphépoxydes selon l'invention, dans le cadre de tests biologiques, une fraction du produit obtenu est purifié par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. Avant chaque étape chromatographique et pour une meilleure isolation du produit, on effectue un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline de la fraction à purifier pour dégrader les sous produits (UDP et UMP) et l'UTP n'ayant pas réagi. On prépare de cette manière environ 500 μ l d'une solution aqueuse à 300 μ M de pH neutre de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3-méthyl-3-butène-1-yl) sous forme de sel d'ammonium.

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate γ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] :

75 nmoles (250 μ l d'une solution 300 μ M) de l'uridine 5'-triphosphate γ -3-méthyl-3-butène-1-yl sous forme de sel d'ammonium sont traitées en milieu aqueux de pH neutre par ajout de 108 μ l d'eau iodée à 0,7 mM préparée selon l'exemple 2. La solution est laissée 20 minutes à température ambiante en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit l'uridine 5'-triphosphate γ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] est généré quantitativement (environ 360 μ l d'une solution à 200 μ M).

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate γ - (3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl) :

La solution obtenue à l'étape précédente contenant 75 nmoles de l'uridine 5'-triphosphate γ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] est injectée en plusieurs fractions dans un système d'HPAEC Dionex® DX500 comme décrit dans l'exemple 2. On prépare de cette manière environ 0,5 ml d'une solution aqueuse à 150 μ M de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl) qui est traitée comme dans l'exemple 1 par la mise en œuvre de tests biologiques et/ou la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 5 : Mesure de l'activité antigénique par stimulation de la prolifération des lymphocytes T γ 982 en culture.

Dans une culture *in vitro* de 10⁶ lymphocytes T totaux dans 1ml, séparés à partir du sang d'un donneur humain sain adulte et contenant

initialement de 1-5% de lymphocytes Ty982 en milieu de culture adéquat (RPMI 1640+10% de sérum humain inactivé et 50 U/ml d'interleukine 2 humaine (hIL-2), on rajoute 20 microlitres de solution aqueuse du composé selon l'invention à tester amené à la concentration finale spécifiée dans l'essai. Après 4 jours de culture, on rajoute par millilitre de milieu de culture 50 U d'hIL-2. Après huit jours les cellules sont énumérées, collectées, lavées par un tampon phosphate, et les cellules de type Ty982 sont révélées dans la culture par un marquage avec les réactifs commerciaux usuels (Anticorps monoclonaux fluorescéinés) et leur proportion déterminée par une analyse de cytométrie en flux. On prend en compte soit le changement de la proportion, soit l'augmentation numérique des cellules Ty982 dans des cultures en présence du composé selon l'invention par rapport à des cultures exemptes de composé selon l'invention. On représente le résultat de ces essais en traçant les courbes de ces valeurs (ordonnées figure 1) en fonction de la concentration en échelle logarithmique de composé selon l'invention mis en culture (abscisses figure 1).

La figure 1 représente les résultats obtenus avec le composé selon l'invention obtenu à l'exemple 1 (Epoxy-PP), la ligne en pointillés représentant un contrôle négatif (valeur obtenue en l'absence de composé selon l'invention).

Le tableau suivant illustre les valeurs de DE50, dose efficace à 50 % de l'effet maximal d'amplification lymphocytaire polyclonale obtenu comme indiqué ci-dessus, avec l'IPP (à titre comparatif), et avec différents composés selon l'invention.

MOLECULE			DE 50% nM
Nom	Abréviation	Structure	
isopentényl pyrophosphate	IPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \end{array}$	3000
3,4-époxy-3- méthyl-1-butyl- diphosphate	Epoxy-PP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} \\ \backslash \quad / \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \end{array}$	20
3,4-époxy-3- méthyl-1-butyl- triphosphate	Epoxy-PPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} \\ \backslash \quad / \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPP} \end{array}$	100

REACTIF	Bioactivité après traitement chimique :				
	aucun	Na IO ₄	Na BH ₃ CN	KMnO ₄	Br ₂ ,H ₂ O
		(5mM)	(10mM pH7)	(1mM)	(7mM)
Tubag	+	+	+	-	-
Epox-PP	+	+	+	+	+

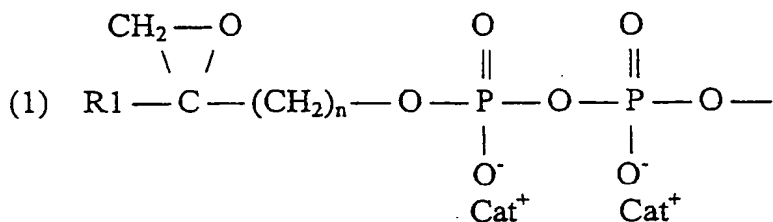
On constate que le traitement des phosphoantigènes naturels mycobactériens Tubag par le KMnO₄ dilué ou par l'eau de brome abroge complètement leur bioactivité. Par contre les composés phosphoépoxides selon l'invention qui sont stimulants à des concentrations de l'ordre de 20 nM résistent à ces mêmes traitements chimiques, ce qui démontre la différence de structure chimique entre les composés synthétiques selon l'invention et les Tubag d'origine naturelle.

10 EXEMPLE 8: Toxicité d' Epox-PP (sel de sodium):

Cinq souris de 30g ont reçu une injection intraveineuse (veine caudale) de 300 µl de tampon PBS contenant 1 mg d'Epox-PP (sel de sodium). On n'observe aucun signe de choc ou de pyrogénicité : 5 souris sont survivantes à 30 jours; aucune variation significative du poids des souris n'est notée au cours de l'étude. La toxicité est donc inférieure à 20 % pour une dose de 33,4 g d'Epox-PP (sel de sodium) par kilogramme d'animal.

REVENDECATIONS

1/ - Composés comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :



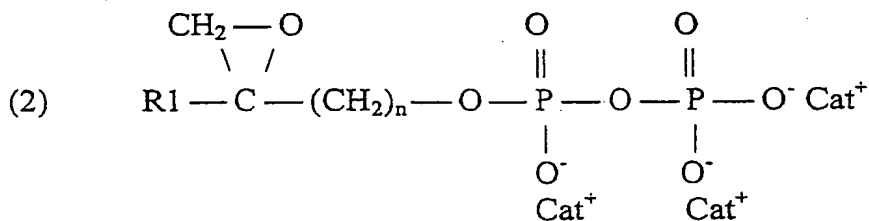
où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

Cat⁺ est un cation organique ou minéral,

n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives.

2/ - Composés phosphoépoxydes de formule :



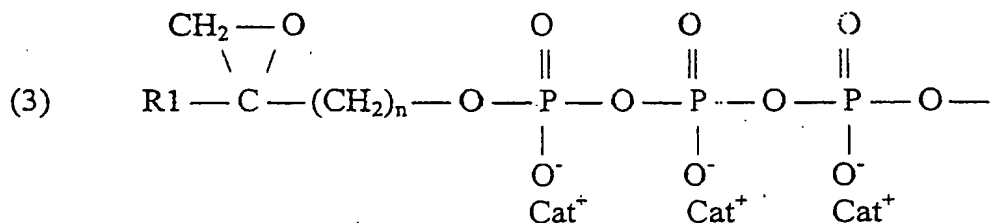
où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

Cat^+ est un cation organique ou minéral,

n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives.

3/ - Nouveaux composés comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :

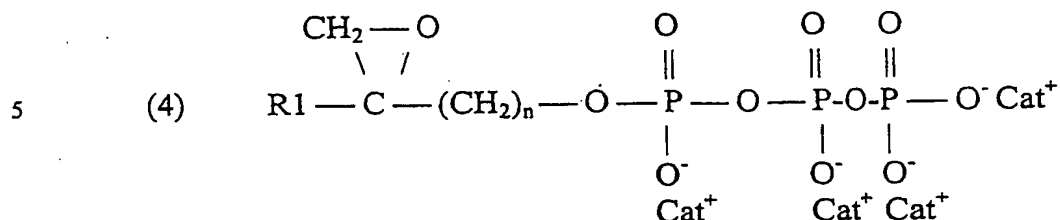


où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

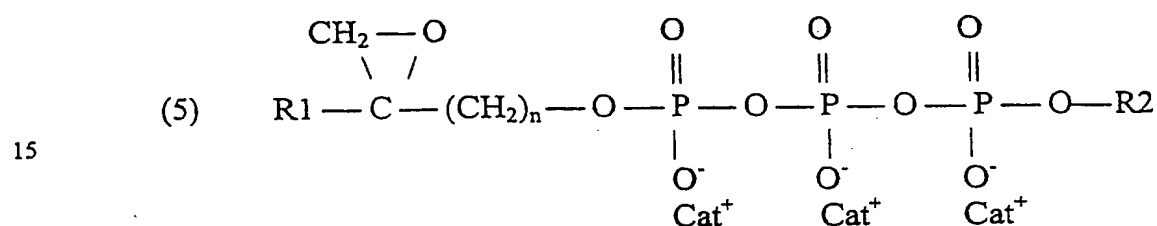
Cat^+ est un cation organique ou minéral

n est un nombre entier compris entre 2 et 20.

4/ - Nouveaux composés phosphoépoxydes selon la revendication 3 de formule :

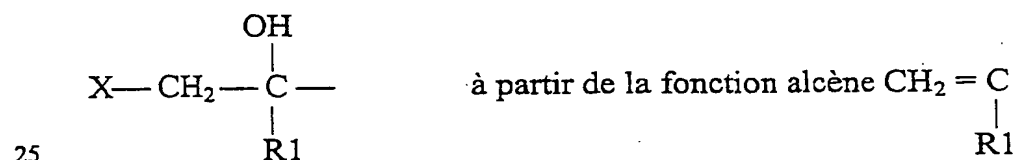


10 5/ - Nouveaux composés phosphoépoxydes selon la
revendication 3, de formule :



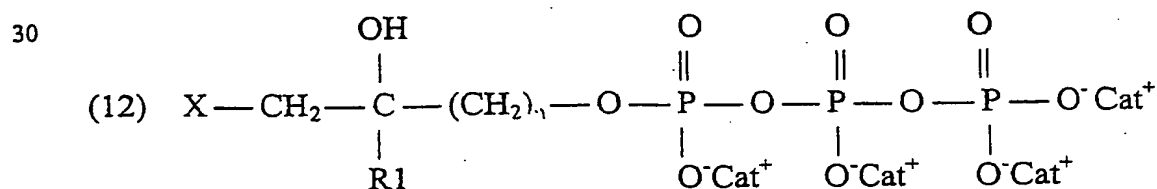
où R2 est un substituant organique ou minéral choisi dans le groupe formé :

20 - des substituants qui n'empêchent pas la formation de la fonction halohydrine

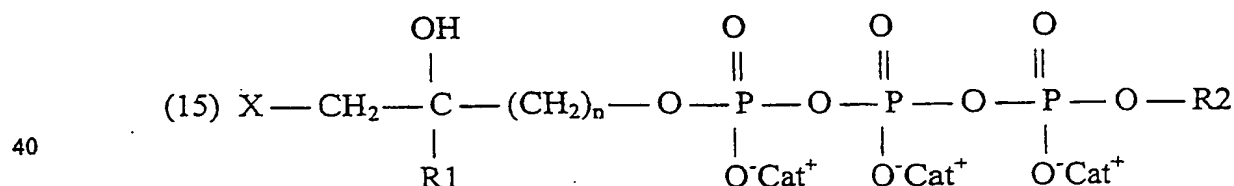


et de l'halogène X_2 en présence d'eau ;

- et des substituants pour lesquels il existe un composé R²-O-Y non réactif sur la fonction halohydrine du composé de formule :



35 et choisi pour que R2-O-Y puisse réagir sur le phosphate terminal de ce composé
(12) pour obtenir le composé (15) :



- et des substituants pour lesquels il existe un composé R²-O-PPP, où PPP symbolise le groupement triphosphate.

6/ - Composés selon l'une des revendications 1, 3 et 5, comprenant au moins un groupement choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, et des époxydes.

7/ - Composés selon les revendications 5 et 6, dans lesquels R² est en outre choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, des phosphoépoxydes selon la formule (1), et des époxydes.

8/- Nouveaux composés phosphoépoxydes de formule :



(21)

où R¹ est choisi parmi —CH₃ et —CH₂—CH₃,

n est un nombre entier compris entre 2 et 20.

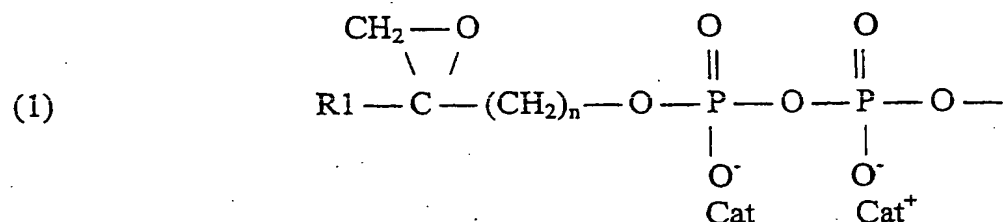
9/- Composés selon l'une des revendications 3 à 5, 7 ou 8 pour leur utilisation comme substance thérapeutiquement actives.

10/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 9 pour leur utilisation comme agents activateurs des lymphocytes Ty982.

11/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 10 pour leur utilisation à titre d'antigènes des lymphocytes Ty982 dans une composition

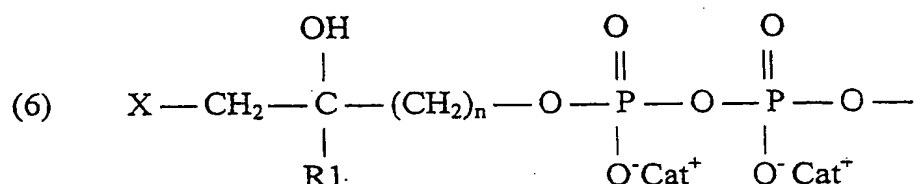
thérapeutique -notamment une composition immunostimulante ou un vaccin pour les primates.

12/- Procédé de fabrication d'un composé comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :



où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Cat⁺ est un cation organique ou minéral, n est un nombre entier compris entre 2 et 20, caractérisé en ce que :

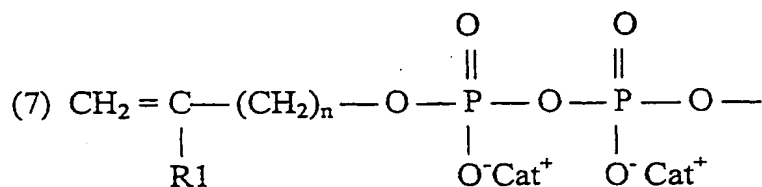
- on prépare tout d'abord un composé intermédiaire comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule :



où X est un halogène choisi parmi I, Br, Cl,

25 - on fait réagir le composé intermédiaire avec un milieu
générateur d'hydroxydes pour transformer les fonctions halohydrines du composé
intermédiaire en fonctions époxydes.

13/ - Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que pour préparer ledit composé intermédiaire, on fait réagir l'halogène X₂ en présence d'eau avec un composé de départ comprenant au moins un groupement alcène phosphaté de formule :



14/- Procédé selon l'une des revendications 12 et 13, caractérisé en ce qu'on fait réagir le composé intermédiaire en milieu aqueux

basique pour transformer les fonctions halohydrines du composé intermédiaire en fonctions époxydes.

15/ - Composition pour le diagnostic extracorporel, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un composé selon l'une des revendications 3 à 5, 7 ou 8.

16/ - Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8.

17/ - Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8.

18/ - Composition selon l'une des revendications 15 et 17, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre des lymphocytes Ty982 de primates.

19/ - Composition selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une proportion d'interleukine adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu où elle est destinée à être administrée.

20/ - Procédé de fabrication d'une composition ayant la propriété d'activer les lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8.

21/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8.

22/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8.

23/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie sélectionnée dans le groupe formé des

cancers, des maladies infectieuses, des parasitoses, et des pathologies à syndrome d'immunodéficience, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8.

24/ - Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, dans
5 lequel on met au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11 au contact d'un milieu contenant des lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T, en une quantité adaptée pour activer les lymphocytes Ty982 dans ce milieu.

25/ - Procédé selon la revendication 24, dans lequel ledit
10 milieu comprend une substance choisie parmi le sang des primates et les extraits de sang des primates.

26/ - Procédé d'activation extracorporelle de lymphocytes Ty982 de primates, dans lequel on met les lymphocytes Ty982 au contact d'au moins un composé tel que défini à l'une des revendications 1 à 8 dans un milieu
15 extracorporel contenant les lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T.

27/ - Procédé selon la revendication 26, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 8 à une concentration dans le milieu qui procure une activation de la prolifération
20 polyclonale des lymphocytes Ty982.

28/ - Procédé selon l'une des revendications 26 à 27, dans lequel on introduit dans le milieu une proportion d'interleukine adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu.

1 / 2

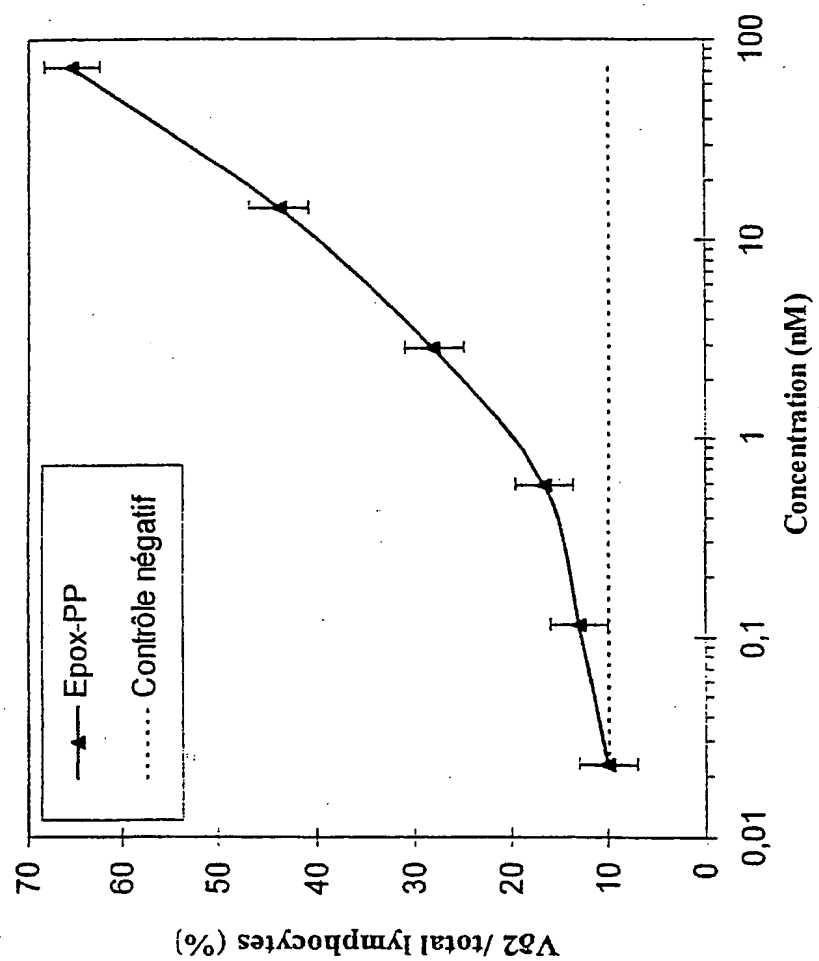


Fig. 1

2/2

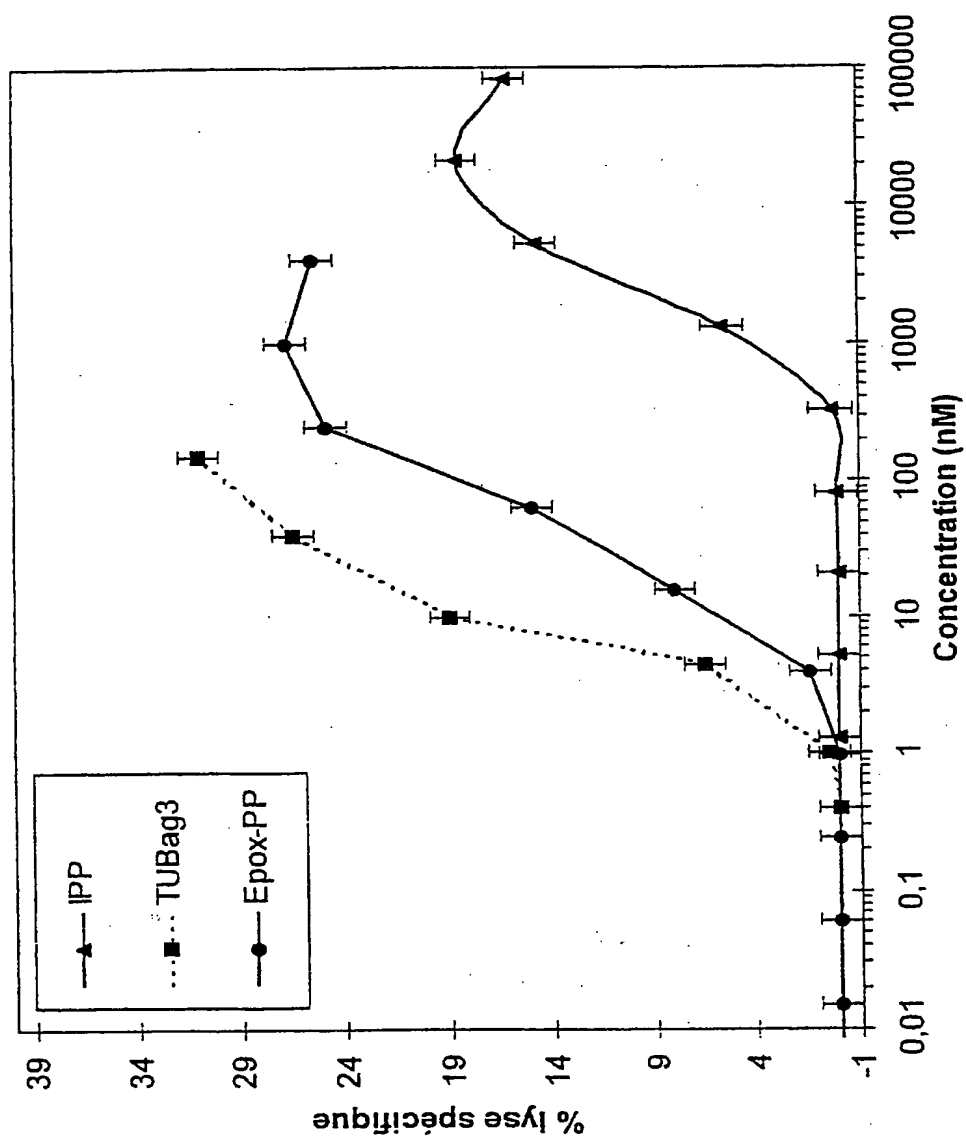


Fig. 2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D/ Internationale No
PCT/FR 99/02057

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07F9/655 C07H19/10 C12N5/06 A61K31/665 A61K49/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07F C07H C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MUEHLBACHER M: "Isopentenyl-diphosphate isomerase: inactivation of the enzyme with active-site-directed irreversible inhibitors and transition-state analogues" BIOCHEMISTRY., vol. 27, no. 19, 1988, pages 7315-7328, XP002102417 EASTON, PA US cité dans la demande * page 7315, composé 6 et page 7319, préparation du composé 6 *	1,2
A	WO 95 20673 A (C.N.R.S.) 3 août 1995 (1995-08-03) cité dans la demande le document en entier	1-28
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 décembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. S1 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Beslier, L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 99/02057

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 639 653 A (BARRY R. BLOOM) 17 juin 1997 (1997-06-17) cité dans la demande le document en entier	1-28
A	TANAKA Y ET AL: "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human.gamma..delta. T cells" NATURE (LONDON) (NATUAS,00280836);1995; VOL.375 (6527); PP.155-8, XP002102418 Albert Einstein College Medicine;Howard Hughes Medical Inst.; Bronx; 10461; NY; USA (US) le document en entier	1-28
A	WESCH D ET AL: "Comparative analysis of.alpha..beta. and.gamma..delta. T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1997; VOL.27 (4); PP.952-956, XP002102419 Paul Ehrlich Institute;Department Immunology; Langen; D-63225; Germany (DE) le document en entier	1-28
A	BUERK M R ET AL: "Human V.gamma.9-V.delta.2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1995; VOL.25 (7); PP.2052-8, XP002102420 University Hospital;Experimental Immunology, Department of Research; Basel; CH-4031; Switz. (CH) le document en entier	1-28
A	SCHOEL B ET AL: "Phosphate is essential for stimulation of V.gamma.9V.delta.2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1994; VOL.24 (8); PP.1886-92, XP002102421 University of Ulm;Department of Immunology; Ulm; Germany (DE) le document en entier	1-28

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Internationale No
PCT/FR 99/02057

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520673 A	03-08-1995	FR 2715660 A	04-08-1995
US 5639653 A	17-06-1997	US 5902793 A	11-05-1999

09/786055
Translation
1632

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

JUL 05 2001

TECH CENTER 1600/2900

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference AN2c-BE8244	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02057	International filing date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)	Priority date (day/month/year) 01 September 1998 (01.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07F 9/655		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 February 2000 (11.02.00)	Date of completion of this report 03 July 2000 (03.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02057

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-36, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-28, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02057

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents cited in the International Search Report were considered relevant in examining the present application. Their numbering will be kept throughout the procedure.

D1: BIOCHEMISTRY, vol. 27, no. 19, 1988, pages 7315-7328, cited in the application

D2: WO 95 20673 A, 3 August 1995 (1995-08-03), cited in the application

D3: US-A-5 639 653, 17 June 1997 (1997-06-17), cited in the application

D4: NATURE; 1995; vol. 375 (6527); pp. 155-8, cited in the application

D5: EUR. J. IMMUNOL.; 1997; VOL. 27 (4); pp. 952-956

D6: EUR. J. IMMUNOL.; 1995; VOL. 25 (7); pp. 2052-8

D7: EUR. J. IMMUNOL.; 1994; VOL. 24 (8); pp. 1886-92

I. Novelty

- 1.1 Document D1 discloses isopentenyl-diphosphate and dimethylallyl-diphosphate analogues. Among these products, compound 6 or 3,4-epoxy-3-methyl-1-butyl diphosphate (see p. 7315, bottom of right column) corresponds to formulae (1) and (2) of Claims 1 and 2 respectively, in which $R^1 = CH_3$ and $n = 2$. However, as emphasised in the description (see p. 6, lines 1 to 3), document D1 describes the *in vitro* effect of said compound as an inhibitor of the enzyme isopentenyl-pyrophosphate isomerase, but it does not teach any therapeutic application of this compound. Consequently, **the**

subject matter of Claims 1 and 2 is novel relative to the content of document D1, and said claims satisfy the requirements of PCT Article 33 (2).

Claims 3 to 11 concern other compounds or preferred examples thereof which are not anticipated in document D1. Thus **the subject matter of Claims 3 to 11 is novel relative to the content of D1**.

The manufacturing methods for the compounds disclosed in document D1 are different from those for the compounds of the present application, although they begin with the same starting product. Indeed, the method according to the invention applies the epoxidation step last, whereas this transformation constitutes the first step of the method according to D1. Consequently, **the subject matter of Claims 12 to 14 is also novel relative to the content of D1**. As document D1 does not disclose a therapeutic composition or a method involving same into play, the **subject matter of Claims 15 to 28 is novel relative to the content of D1**.

Claims 1 to 28 therefore satisfy the requirements of PCT Article 33 (2).

- 1.2 Document D2 discloses non-peptide water-soluble organo-phosphorous compounds that activate human T $\gamma 9 \delta 2$ lymphocytes. These compounds differ from those of the present application in that they do not contain an epoxy function. **Consequently, the subject matter of Claims 1 to 28 is novel relative to the content of D2.**
- 1.3 Document D3 discloses a method for stimulating proliferation of T $V\gamma 2V\delta 2$ cells which involves phosphate compounds, specifically monoalkylphosphates and alkenylpyrophosphates. These compounds do not anticipate the subject matter of the present application, as they do not contain an epoxy group. Thus **the subject matter of Claims 1 to 28 is novel relative to the content of D3.**
- 1.4 Documents D4 to D6 disclose synthetic compounds, comprising phosphate groups, which differ from the subject matter of the present application in that they do not contain an epoxy group. Consequently, **the subject matter of**

Claims 1 to 28 is novel relative to the content of documents D4 to D6.

- 1.5 Document D7 discloses using a ligand with a low molecular weight to stimulate proliferation of T V γ 9V δ 2 cells containing phosphate and carbohydrate groups. As this compound does not contain an epoxy group, it does not fall within the scope of the claims of the present application. Thus **the subject matter of Claims 1 to 28 is novel relative to the content of D7.**

II. Inventive step

The problem to be solved by the present invention is to activate T γ 9 δ 2 lymphocytes by using a small quantity of activating compounds, and so to develop therapeutic methods involving these compounds.

Document D2, which is the closest prior art, discloses non-peptide water-soluble organo-phosphorous compounds, which activate human T γ 9 δ 2 lymphocytes, and contain phosphate groups grafted on carbohydrates.

The solution put forward by the present invention consists of developing new organo-phosphorous compounds for activating T γ 9 δ 2 lymphocytes, these compounds containing both a phosphate group and an epoxy function.

As no prior art suggests this solution, **the subject matter claimed by this application according to Claims 1 to 28 is inventive.** These claims therefore satisfy the requirements of PCT Article 33 (3).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 05 JUL 2000

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire AN2c-BE8244	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02057	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27/08/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 01/09/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07F9/655		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA ...et. al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/02/2000	Date d'achèvement du présent rapport 03.07.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Masson, J-P N° de téléphone +49 89 2399 8728 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02057

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-36 version initiale

Revendications, N°:

1-28 version initiale

Dessins, feuilles:

1/2-2/2 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02057

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Les documents suivants, cités dans le Rapport de Recherche International, ont été considérés comme pertinents pour l'examen de la présente demande. Leur numérotation sera conservée tout au long de la procédure.

- D1: BIOCHEMISTRY, vol. 27, no. 19, 1988, pages 7315-7328, cité dans la demande
- D2: WO 95 20673 A , 3 août 1995 (1995-08-03), cité dans la demande
- D3: US-A-5 639 653 , 17 juin 1997 (1997-06-17), cité dans la demande
- D4: NATURE;1995; VOL.375 (6527); PP.155-8, cité dans la demande
- D5: EUR. J. IMMUNOL.;1997; VOL.27 (4); PP.952-956
- D6: EUR. J. IMMUNOL.;1995; VOL.25 (7); PP.2052-8
- D7: EUR. J. IMMUNOL.;1994; VOL.24 (8); PP.1886-92

I. Nouveauté

- I.1 Le document D1 divulgue des analogues du diphosphate d'isopentényle et du diphosphate de diméthylallyle. Parmi ces produits, le composé 6, ou diphosphate de 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyle (voir schéma P. 7315, colonne de droite en bas), correspond aux formules (1) et (2) des revendications 1 et 2, respectivement, dans lesquelles $R^1 = CH_3$ et $n = 2$. Cependant, comme souligné dans la description (voir P. 6 lignes 1-3), le document D1 décrit l'effet *in vitro* dudit composé en tant qu'inhibiteur de l'enzyme isopentényl pyrophosphate isomérase mais n'enseigne aucune application thérapeutique de ce composé. Par conséquent, **l'objet des revendications 1 et 2 est nouveau par rapport au contenu du document D1** et ces dernières satisfont les conditions requises à l'Art. 33(2) PCT.

Les revendications 3-11 concernent d'autres composés ou des exemples préférés de ces derniers qui ne sont pas anticipés par le contenu du document D1. Ainsi, **l'objet des revendications 3-11 peut être considéré comme nouveau par rapport au contenu de D1.**

Les procédés de fabrication des composés divulgués dans le document D1 sont différents de ceux des composés de la présente demande, bien que partant du même produit de départ. En effet, le procédé selon l'invention fait intervenir l'étape d'époxydation en dernier lieu, alors que cette transformation constitue la première étape dans le procédé selon D1. Par conséquent, **l'objet des revendications 12-14 peut également être considéré comme nouveau par rapport au contenu de D1.** Le document D1 ne divulguant pas de composition thérapeutique ni de procédé les mettant en jeu, **l'objet des revendications 15-28 est nouveau par rapport au contenu de D1.**

Les revendications 1-28 satisfont donc aux conditions requises à l'Art. 33(2) PCT.

- I.2 Le document D2 divulgue des composés organophosphorés hydrosolubles non-peptidiques, activateurs des lymphocytes Ty9δ2 humains. Ces composés se distinguent de ceux de la présente demande en ce qu'ils ne contiennent pas de fonction époxy. Par conséquent, **l'objet des revendications 1-28 peut être considéré comme nouveau par rapport au contenu de D2.**
- I.3 Le document D3 divulgue une méthode de stimulation de la prolifération des cellules T Vy2Vδ2 impliquant des composés phosphatés, en l'occurrence des monoalkylphosphates et des alkénylpyrophosphates. Ces composés n'anticipent pas l'objet de la présente demande puisqu'ils ne contiennent pas de groupement époxy. Ainsi, **l'objet des revendications 1-28 peut être considéré comme nouveau par rapport au contenu de D3.**
- I.4 Les documents D4-D6 divulguent des composés synthétiques, comportant des groupements phosphates, qui se distinguent de l'objet de la présente demande en ce qu'ils ne contiennent pas de groupement époxy. Par conséquent, **l'objet des revendications 1-28 peut être considéré comme nouveau par rapport au contenu des documents D4-D6.**
- I.5 Le document D7 divulgue l'utilisation d'un ligand de faible poids moléculaire comme

stimulateur de la prolifération des cellules T V γ 9V δ 2, contenant des groupements phosphates et carbohydrates. Comme ce composé ne contient pas de groupement époxy, il ne tombe pas sous le coup des revendications de la présente demande. Ainsi, **l'objet des revendications 1-28 peut être considéré comme nouveau par rapport au contenu de D7.**

II. Activité inventive

Le problème à résoudre par la présente invention consiste à activer des lymphocytes T γ 9 δ 2 en utilisant une faible quantité de composés activateurs et à développer ainsi des procédés thérapeutiques impliquant ces composés.

Le document D2, qui représente l'art antérieur le plus rapproché, divulgue des composés organophosphorés hydrosolubles non-peptidiques, activateurs des lymphocytes T γ 9 δ 2 humains, contenant des groupements phosphates greffés sur des carbohydrates.

La solution proposée par la présente invention consiste à développer de nouveaux composés organophosphorés comme activateurs des lymphocytes T γ 9 δ 2, ces composés contenant à la fois un groupement phosphate et une fonction époxy.

Comme aucun document de l'art antérieur ne suggère cette solution, **l'objet revendiqué par la présente demande selon les revendications 1-28 peut être considéré comme inventif.** Ces revendications satisfont donc aux conditions requises à l'Art. 33(3) PCT.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET BARRE LAFORGUE & ASSOCIES
95, rue des Amidonniers
F-31000 Toulouse
FRANCE

- 6 AVR. 2000

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 mars 2000 (09.03.00)		AVIS IMPORTANT	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire AN2c-BE8244			
Demande internationale no PCT/FR99/02057	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 août 1999 (27.08.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 01 septembre 1998 (01.09.98)	
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE etc			

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,CN,EP,JP,KP,KR,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,
GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PE,
PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 09 mars 2000 (09.03.00) sous le numéro WO 00/12519

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

Suite du formulaire PCT/IB/308

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 mars 2000 (09.03.00)	AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire AN2c-BE8244	Demande internationale no PCT/FR99/02057
<p>Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.</p>	